

**Nukleotidsequenz und Sekundärstruktur
des Viroids der Spindelknollensucht
der Kartoffel
(potato spindle tuber viroid, PSTV)**

Horst Domdey

1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41551913_0042

DISSERTATIONS- UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Nukleotidsequenz und Sekundärstruktur
des Viroids der Spindelknollensucht der Kartoffel
(potato spindle tuber viroid, PSTV)

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des
Fachbereichs Chemie und Pharmazie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Horst Domdey
aus
Sulzbach-Rosenberg

1979



1. Berichterstatter:	Prof. Dr. W. Zillig
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Hartmann
Tag der mündlichen Prüfung:	8.5.1979

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried bei München in der Abteilung "Organische Chemie und Spektroskopie" (kommissarische Leitung: Prof. Dr. G. Ruhenstroth-Bauer) unter der Anleitung von Herrn Dr. habil. H. J. Gross in der Zeit von Februar 1976 bis September 1978 durchgeführt.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. H. J. Gross für seine stete Hilfe, seine vielen guten Ratschläge und für zahlreiche kritische Diskussionen.

Herrn Prof. Dr. H. L. Sänger, Giessen, danke ich für die Reinigung und Bereitstellung verschiedener Viroide.

Fräulein H. Alberty möchte ich herzlich danken für wertvolle Hilfe bei der Durchführung einiger Versuche, sowie allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe für anregende Diskussionen.

Schließlich danke ich der Studienstiftung des Deutschen Volkes für ein großzügiges Promotionsstipendium.

Inhaltsverzeichnis:

	Seite
1. Einleitung	1
2. Problemstellung	4
3. Ergebnisse und Diskussion	5
3.1. Methodisches	5
3.1.1. Probleme der Sequenzanalyse von Viroid-RNA mittels der <u>in vitro</u> 5'-Phosphorylierung mit γ - ³² P-ATP und T4-Polynukleotidkinase	5
3.1.2. Die Gradienten-Dünnschichtchromatographie als Alternative zur Homochromatographie	10
3.1.3. Sequenzanalyse von RNA im Nanogramm-Bereich durch eine Kombination von <u>in vitro</u> 5'- ³² P-Markierungen	20
3.2. Sequenzanalyse von PSTV	28
3.2.1. Vollständige Spaltungen von PSTV, 5'-Phosphorylierung, Auftrennung, Sequenzierung und Stöchiometrie der Spaltprodukte	28
3.2.1.1. Vollständige Spaltung mit Ribonuklease T ₁ bzw. Ribonuklease A, 5'- ³² P-Markierung und Auftrennung der erhaltenen Oligonukleotide	28
3.2.1.2. Sequenzierung der rein isolierten Oligonukleotide	35
3.2.1.3. Stöchiometrie der einzelnen Oligonukleotide	47
3.2.2. Kontrollierte Spaltungen von PSTV, 5'-Phosphorylierung, Auftrennung und Sequenzierung der langen Spaltprodukte	50
3.2.2.1. Darstellung, 5'-Phosphorylierung, Auftrennung und Isolierung langer, überlappender Oligonukleotide von PSTV	50
3.2.2.2. Sequenzanalyse langer Oligonukleotide	54

3.2.3.	Primär- und Sekundärstruktur von PSTV	76
3.2.3.1.	Erstellung der Primärstruktur	76
3.2.3.2.	Ableitung der Sekundärstruktur	76
3.2.3.3.	Diskussion der Viroid-Struktur	81
3.3.	Vergleich von drei Pflanzen-Viroiden anhand ihrer Fingerprints	92
4.	Experimenteller Teil	96
4.1.	Material und Geräte	96
4.1.1.	Materialien	96
4.1.2.	Geräte	100
4.2.	Methoden	101
4.2.1.	Enzymatische Spaltungen von RNA	101
4.2.1.1.	Enzymatische Spaltungen zur Gewinnung von RNA-Fragmenten	101
4.2.1.2.	Enzymatische Spaltungen 5'- ³² P-markierter Oligonukleotide zur Sequenzanalyse	104
4.2.2.	Darstellung von γ - ³² P-ATP	107
4.2.3.	<u>In vitro</u> 5'- ³² P-Phosphorylierung von RNA und RNA-Oligonukleotiden	108
4.2.4.	Chromatographische und elektrophoretische Trennverfahren	110
4.2.4.1.	Säulenchromatographie	110
4.2.4.2.	Dünnschichtchromatographie	111
4.2.4.3.	Zweidimensionale Auftrennung von Oligonukleotiden durch Hochspannungselektrophorese und Homo- oder Gradienten-Dünnschichtchromatographie	112
4.2.4.4.	Hochspannungselektrophorese auf DEAE-Papier	116
4.2.4.5.	Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese zur Trennung langer 5'-phosphorylierter RNA-Fragmente	117

	Seite
4.2.4.6. Eindimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese zur Sequenzierung langer 5'-phosphorylierter RNA-Fragmente	119
4.2.5. Autoradiographie	122
4.2.6. Fotografische Dokumentation der Auftrennung unmarkierter Oligonukleotide	122
4.2.7. Isolierung 5'-phosphorylierter RNA-Fragmente	123
4.2.7.1. Isolierung nach zweidimensionaler Auftrennung über Hochspannungselektrophorese/Homo- oder Gradienten-Dünnschichtchromatographie	123
4.2.7.2. Isolierung nach zweidimensionaler Polyacrylamidgelelektrophorese	123
4.2.8. Modifikation eines Oligonukleotids mit Bisulfit	126
5. Zusammenfassung	127
6. Literaturverzeichnis	130
Lebenslauf	141

Abkürzungsverzeichnis:

A	Adenosin
A ₂₆₀	Absorbtion bei 260 nm und 1 cm Schichtdicke
1 A ₂₆₀ -Einheit RNA	RNA-Menge, die in 1 ml H ₂ O gelöst bei 260 nm und 1 cm Lichtweg eine Absorbtion von 1 ergibt ($\hat{=}$ 50 μ g RNA)
mA	Milliampere
Ac	Acetat
ATP	Adenosintriphosphat
⬡ _B , B	blauer Farbstoff Xylen-Cyanol
C	Cytidin
m ⁵ C	5-Methylcytidin
CCCV	" <u>c</u> oconut <u>c</u> adang- <u>c</u> adang <u>v</u> iroid"
CCMV	" <u>c</u> hrysanthemum <u>c</u> hlorotic <u>m</u> ottle <u>v</u> iroid"
CEV	" <u>c</u> itrus <u>e</u> xocortis <u>v</u> iroid"
CEV-gyn	" <u>c</u> itrus <u>e</u> xocortis <u>v</u> iroid", vermehrt auf <u>Gynura</u>
Ci	Curie
CM-RNase	Modifizierte <u>C</u> -Carboxymethyllysin-41 pankreatische Ribonuklease
CPFV	" <u>c</u> ucumber <u>p</u> ale <u>f</u> ruit <u>v</u> iroid"
cpm	Impulse pro Minute (<u>c</u> ounts <u>p</u> er <u>m</u> inute)
CSV	" <u>c</u> hrysanthemum <u>s</u> tunt <u>v</u> iroid"
CSV-chr	" <u>c</u> hrysanthemum <u>s</u> tunt <u>v</u> iroid", ver- mehrt auf Chrysantheme
CSV-cin	" <u>c</u> hrysanthemum <u>s</u> tunt <u>v</u> iroid", ver- mehrt auf <u>Cineraria</u>
CV	" <u>C</u> olumnea <u>v</u> iroid"
DEAE-	Diäthylaminoäthyl-
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure

E	Einheit(en)
G	Guanosin
h	Stunden
HSV	" <u>h</u> op <u>s</u> tunt <u>v</u> iroid"
l	Liter
M	molar (Konzentration)
"M"	"M"-Wert (<u>m</u> igration value)
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
N	Nukleosid
Na ₂ EDTA	Natrium-Äthylendiamintetraacetat
p	Phosphat, z. B.: Ap = Adenosin-3'-Phosphat pA = Adenosin-5'-Phosphat
PEI	Polyäthylenimin
Phosphat in Oligonukleotiden	Auf die Angabe der Phosphodiester- bindungen, sowie der 5'-Phosphate bei Oligonukleotiden wurde zumeist verzichtet; z. B.: AUG = 5' pApUpG 3'
P _i	Anorganisches Phosphat
PSTV	" <u>p</u> otato <u>s</u> pindle <u>t</u> uber <u>v</u> iroid"
PSTV-tom	" <u>p</u> otato <u>s</u> pindle <u>t</u> uber <u>v</u> iroid", ver- mehrt auf Tomate
Pu	Purin
Py	Pyrimidin
Ref.	Referenz
RNA	Ribonukleinsäure
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Nukleinsäure
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
tRNA ^{Phe}	Phenylalanin-akzeptierende Transfer- Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
TEAB	Triäthylammoniumbicarbonat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyläthylendiamin

Tris

U

Ψ

UV

V

 X, X

 Y, Y

Trishydroxymethylaminomethan

Uridin

Pseudouridin

ultraviolett

Volt

blauer Farbstoff Xylen-Cyanol

gelber Farbstoff Methylorange

1. Einleitung

Als Mikroorganismen werden im allgemeinen all jene Organismen bezeichnet, die als Individuum mit bloßem Auge nur schlecht oder gar nicht mehr zu erkennen sind. Aufgrund ihrer Zellstruktur lassen sie sich in zwei deutlich unterscheidbare Gruppen einteilen:

1. Die höheren, eukaryotischen Protisten, zu denen Algen, Pilze, Protozoen und wenige Metazoen gehören.
2. Die niederen, prokaryotischen Protisten, wozu Bakterien und Blaualgen gerechnet werden, die sich in ihrem Zellaufbau beträchtlich von allen anderen Organismen unterscheiden.

Daneben existiert noch eine Gruppe von nichtzellulären, akaryotischen "Organismen": die Viren. Diese besitzen eine bei weitem einfachere Struktur als Prokaryonten und Eukaryonten. Ihre Größe und Gestalt ist sehr heterogen: Von der fast kugeligen Form des MS2 - Phagen mit einem Durchmesser von weniger als 20 nm über den stäbchenförmigen Tabakmosaikvirus und die komplizierten, geschwänzten Bakteriophagen bis zu den quaderförmigen Vaccinia-Viren von 250 - 300 nm Durchmesser (Abb. 1).

Die allgemeine Struktur eines Virus zeigt dabei einen inneren Nukleinsäurekern, der entweder aus RNA oder DNA besteht und von einer Proteinhülle, dem Capsid, umgeben ist; letzteres kann wiederum aus individuellen Untereinheiten bestehen, den sog. Capsomeren. Das Nucleocapsid kann noch von einer weiteren Hülle umgeben sein.

Als genetisches Material der Viren ist sowohl RNA als auch DNA in allen möglichen Kombinationen von Einzel- oder Doppelsträngigkeit mit Linearität oder Zirkularität - mit Ausnahme von einzelsträngiger zirkulärer RNA - gefunden worden.

Das Molekulargewicht viraler Nukleinsäuren reicht dabei von ca. 10^6 bis zu mehr als 10^8 Dalton.

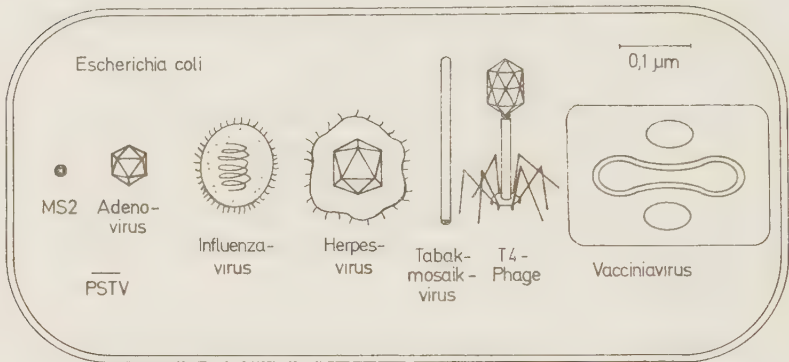


Abb. 1: Aufbau und Größe einiger Viren und eines Viroids (PSTV) im Vergleich zur Größe des Bakteriums *Escherichia coli* (der Durchmesser einer Hefezelle entspricht etwa der 5-fachen Länge des *E. coli* - Bakteriums).

Eine neue Klasse von Pathogenen, die sog. Viroide, wurden zu Beginn der siebziger Jahre von amerikanischen, kanadischen und deutschen Arbeitsgruppen bei der Suche nach Krankheiten wirtschaftlich bedeutender Nutzpflanzen entdeckt (1 - 4). Im Gegensatz zu konventionellen Viren und deren infektiösen Nukleinsäuren sind Viroide nur äußerst kleine infektiöse Agentien (s. Abb. 1). Es handelt sich bei ihnen um RNA-Moleküle mit einem Molekulargewicht von ca. 75000 - 130000 Dalton (5), die jedoch von keiner Eiweißhülle umgeben sind.

Bis heute sind acht Viroide bekannt, die Krankheiten in höheren Pflanzen verursachen:

1. PSTV, potato spindle tuber viroid, verursacht die Spindelknollensucht der Kartoffel (1, 2).
2. CEV, citrus exocortis viroid, ist der Erreger der Exocortis-Krankheit von Citrus (3, 4).
3. CPFV, cucumber pale fruit viroid, bedingt die Gelbfrüchtigkeit der Gurke (6).
4. CSV, chrysanthemum stunt viroid, ist der Erreger der Stauche-Krankheit der Chrysantheme (7, 8).
5. CCMV, chrysanthemum chlorotic mottle viroid, ruft die chlorotische Blattflecken-Krankheit der Chrysantheme hervor (9).
6. CCCV, coconut cadang-cadang viroid, ist für die Cadang-Cadang-Krankheit der Kokospalme verantwortlich (10, 11).
7. HSV, hop stunt viroid, bewirkt die Stauche-Krankheit des Hopfens (12).
8. CV, Columnea viroid, ist mit - bisher noch nicht genauer beschriebenen - Krankheitssymptomen bei Columnea assoziiert (13).

Die Krankheitsbilder, die Viroide an Pflanzen hervorrufen, sind vorwiegend Mißbildungen, Gelbfleckungen und Vergilben von Blättern und Wachstumshemmung. Diese Symptome ähneln damit denen, die von klassischen Pflanzenviren verursacht werden.

Die Viroid-Infektion kann sowohl auf mechanischem Wege durch Verletzungen und Wunden als auch möglicherweise durch Samen und Pollen geschehen. Hauptüberträger scheint in erster Linie der Mensch zu sein, zum Beispiel beim Ernten der Blüten, Früchte oder Knollen, wenn die Pflanzen dabei mit infizierten Werkzeugen verletzt werden, oder bei der vegetativen Vermehrung latent infizierten Materials (Stecklings-

veredelung, Knollenteilung, Meristemvermehrung). Eine erfolgreiche Bekämpfung der Viroid-Erkrankungen ist nur durch geeignete Präventivmaßnahmen, verbunden mit der Selektion viroidfreien Pflanzenmaterials, möglich.

2. Problemstellung

Zu Beginn dieser Arbeit lagen über Größe und Struktur von Viroiden nur recht vage und z. T. einander widersprechende Daten vor. So wurden für PSTV Molekulargewichte von 50000 (1) bis 89000 (14) angegeben. Vorstellungen über die Sekundärstruktur (doppelsträngige oder einzelsträngige RNA in linearer oder zirkulärer Form) basierten lediglich auf Spekulationen.

1976 konnten Sänger et al. zeigen, daß es sich bei den von ihnen untersuchten Viroiden (PSTV, CPFV und CEV) um einzelsträngige, kovalent geschlossene, ringförmige Ribonukleinsäuren mit einem Molekulargewicht von ca. 110000 - 127000 Dalton handelt, die in ihrem nativen Zustand als stäbchenförmige Moleküle vorliegen (15).

Ziel dieser Arbeit war:

1. Durch "Fingerprint"-Analysen sollte festgestellt werden, ob von verschiedenen Wirten isolierte Viroide identisch oder verschieden sind.
2. Die vollständige Primär- und Sekundär-Struktur eines Viroids (PSTV-tom) sollte ermittelt werden, weil dies der erste und exakteste Schritt ist zum Verständnis der Zusammenhänge zwischen Struktur und Funktion (Wirtsspezifität, Pathogenität, Infektiosität, Replikation etc.) bei Viroiden.

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Methodisches

3.1.1. Probleme der Sequenzanalyse von Viroid-RNA mittels der in vitro 5'-Phosphorylierung mit γ -³²P-ATP und T4-Polynukleotidkinase

In den letzten Jahren hat es zahlreiche methodische Fortschritte auf dem Gebiet der Nukleinsäure-Sequenzierung gegeben: Bedingt durch diese Entwicklung, die dazu geführt hat, daß es heute unvergleichlich leichter ist, DNA zu sequenzieren als RNA, konnten beispielsweise die Primärstrukturen der DNA des Bakteriophagen ØX174 (16) und des verwandten Bakteriophagen G4 (17) bestimmt werden. In wesentlich aufwendigerer Arbeit wurde die Struktur der RNA des Bakteriophagen MS2 ermittelt (18).

Für die Sequenzierung von Ribonukleinsäuren gibt es prinzipiell mehrere Möglichkeiten:

Das klassische, von Holley et al. (19) entwickelte Verfahren benötigt mehrere 100 mg an Material. Es wurden damit vor allem tRNAs sequenziert, die in größeren Mengen verfügbar waren.

Für Ribonukleinsäuren, die in vivo radioaktiv mit ³²P markiert werden können, wurden sog. Fingerprint-Methoden eingeführt, die mit Hilfe ionophoretischer Trennverfahren arbeiten. Die Primärstrukturen von vielen tRNAs (20), von 5S rRNAs (21), der ribosomalen 16S RNA von E. coli (22) oder der RNA des Phagen MS2 (18) sind Beispiele für die Anwendung dieses Verfahrens.

Nun gibt es aber auch Ribonukleinsäuren, die weder in großen Mengen isoliert, noch in vivo ausreichend radioaktiv markiert werden können. Dies gilt zum Beispiel für

mRNA, die dann mittels reverser Transkriptase in komplementäre DNA umgeschrieben wurde (23); auch 18S rRNA wurde vom 3'-Ende bis zu den beiden Dimethyladenosinen in cDNA umgeschrieben (24). Diese cDNAs können dann mittels schneller und eleganter Methoden (25 - 28) sequenziert werden. Die Sequenzierung einer tRNA nach Umschreibung in komplementäre DNA mittels DNA-Polymerase (Klenow-Enzym) ist ebenfalls kürzlich gelungen (29).

Zur Ermittlung der Sequenz solcher Ribonukleinsäuren, die nicht in komplementäre DNA umgeschrieben werden können, gibt es die in vitro - Markierung mit ^{32}P , ^3H oder (allerdings mit Einschränkungen) ^{125}J (30 - 33).

Viroide bilden ein Beispiel für nur in geringen Mengen verfügbare RNA. Sie vermehren sich nur langsam und liegen deshalb in infizierten Pflanzen in sehr kleinen Mengen vor: 1 kg infizierter Pflanzenblätter liefert nur selten mehr als ca. 50 - 250 μg hochgereinigtes Viroidmaterial (34).

Weiterhin ist Viroid-RNA in vivo nur sehr schwach mit radioaktivem Phosphor markierbar, d. h. die spezifische Aktivität von Viroid-RNA aus Pflanzen, die in Nährlösungen mit ^{32}P -Orthophosphat wachsen, ist wegen der verhältnismäßig niedrigen Replikationsrate von Viroid-RNA äußerst gering (35). Ein vollständiges Umschreiben von Viroid-RNA in DNA ist bisher ebenso noch nicht gelungen (36, 37).

Es ist durchaus möglich, ^{125}J -markiertes Viroid-Material für vergleichende Fingerprint-Analysen verschiedener Viroide zu benutzen (38 - 40). Auch die vorliegende Arbeit wurde mit Untersuchungen an ^{125}J -markierten Viroiden begonnen. Allerdings wurde diese Methode nicht weiterverfolgt, da die Möglichkeit zur Interpretation von ^{125}J -Fingerprints sehr begrenzt ist: All jene RNase T_1 - Oligonukleotide, die kein Cytidin enthalten, ebenso wie alle RNase A - Oligo-

nukleotide mit einem 3'-terminalen Uridin bleiben unmarkiert. Weiterhin kann die Jod-Substitution die elektrophoretische und chromatographische Mobilität der Oligonukleotide ändern, so daß es ziemlich schwierig wird, von der Position auf dem Fingerprint Schlüsse auf die Nukleotidzusammensetzung des Oligonukleotids zu ziehen. Schließlich - und das ist wohl entscheidend - können ^{125}J -markierte Oligonukleotide nur mit Einschränkungen und großen Schwierigkeiten sequenziert werden (41). Eine Markierung in vitro mit Tritium hat den Nachteil, daß wegen der schwachen Strahlung die Auswertung von Versuchen mittels Autoradiographie viel zu lange dauern würde.

Als einzige Alternative für die Sequenzanalyse von Viroid-RNA bleibt deswegen die in vitro 5'- ^{32}P -Phosphorylierung mit Hilfe von γ - ^{32}P -ATP und T4 Phagen - induzierter 5'-Poly-nukleotidkinase aus E. coli. Dieses Enzym überträgt das γ -Phosphat des γ - ^{32}P -ATP auf die freie 5'-OH-Gruppe von Oligonukleotiden und 3'-Nukleotiden. Durch diese radioaktive Markierung wird die Sequenzierung auch von solchen Nukleinsäuren ermöglicht, die in vivo nicht oder nur schlecht markierbar und nur in sehr geringen Mengen verfügbar sind und die auch nicht in komplementäre DNA umgeschrieben werden können.

Zu Beginn dieser Arbeit waren allerdings nicht einmal tRNAs allein mit Hilfe dieses Verfahrens sequenziert worden, d. h. deren Strukturen waren lediglich unter Berücksichtigung des allgemein anerkannten generellen Bauplans von tRNA aus den Sequenzen der ermittelten RNase T_1 - und RNase A - Oligonukleotide zusammengesetzt worden (42, 43). Eine von allgemeinen tRNA-Strukturdaten unabhängige Sequenzanalyse von tRNAs allein mittels der in vitro 5'- ^{32}P -Markierung, welche dann die Analyse langer, überlappender Fragmente notwendigerweise mit einschließen muß, war zu diesem Zeitpunkt noch in keinem Labor durchgeführt worden.

Deshalb war es auch damals keineswegs sicher, ob die vollständige Ermittlung der Primär- und Sekundär-Struktur eines Viroids - mit einer geschätzten Kettenlänge von ca. 360 Nukleotiden - allein durch Anwendung dieses noch wenig erprobten Verfahrens im Rahmen dieser Arbeit abgeschlossen werden könnte. Selbst heute gibt es noch keine anderen Ribonukleinsäuren auch nur annähernd ähnlicher Größe, deren Struktur allein mittels ³²P-Markierung in vitro erstellt worden ist. So ist zum Beispiel - wenn man von einigen wenigen tRNAs absieht - lediglich die Sequenz der ersten 74 Nukleotide der Alfalfamosaikvirus-RNA (44) und der ersten 89 Nukleotide der messenger-RNA, die für das Lipoprotein der äußeren E. coli - Membran codiert (45), bekannt. Beide RNAs besitzen allerdings - im Gegensatz zu Viroid-RNA - den unschätzbaren Vorteil, daß sie lineare Moleküle sind, deren 5'-Enden leicht markiert und sequenziert werden konnten.

Es sind nun in jüngster Zeit Methoden entwickelt worden, die eine schnelle Sequenzierung von RNA auf Polyacrylamidgelen ermöglichen:

Das von Donis-Keller et al. beschriebene Verfahren macht dabei die genaue Lokalisierung von Adenosinen und Guanosinen in einer RNA möglich, während die Pyrimidine zwar als solche erkannt, jedoch nicht als Uridin oder Cytidin identifiziert werden können (46). Die von Simoncsits et al. publizierte Methode (47) beruht ebenfalls auf der Polyacrylamidgелеlektrophorese, hatte jedoch außerdem zum Ziel, Cytidine und Uridine durch Verwendung eines neuen Enzyms, der RNase Phy I aus Physarum polycephalum (32, 48), zu unterscheiden. Wie sich jedoch später in dieser Arbeit zeigen sollte und wie auch andere Autoren berichten (49-51), ist diese Unterscheidung der Pyrimidine, zumindest wenn es sich um Oligo-U- und Oligo-C-Sequenzen handelt, auch mit Hilfe der Physarum-RNase häufig unmöglich.

Daher war es unbedingt notwendig, zusätzlich zu diesen bekannten Methoden neue und zu wirklich eindeutigen Ergebnissen führende Verfahren zu entwickeln, wie es die weiter unten beschriebene Gradienten-Dünnschicht-chromatographie (52) und die "sekundäre" ^{32}P -Phosphorylierung (53) sind.

Eines von vielen weiteren Problemen bei der ^{32}P -Markierung in vitro besteht schließlich auch darin, daß nach einer Folge nicht-quantitativer enzymatischer Reaktionen (RNase-Spaltung, Dephosphorylierung, ^{32}P -Phosphorylierung) am Schluß eine quantitative Aussage, d. h. die genaue Anzahl und exakte Reihenfolge der Nukleotide erwartet wird.

Trotz der genannten Schwierigkeiten schien allein dieses Verfahren den Zugang zur Primär- und Sekundär-Struktur von Viroiden zu ermöglichen.

3.1.2. Die Gradienten-Dünnschichtchromatographie als Alternative zur Homochromatographie (52)

Als übliche Verfahren für die zweidimensionale Auftrennung ³²P-markierter Oligonukleotide kennt man in erster Linie Polyacrylamidgelelektrophorese (54, 55), zweidimensionale Hochspannungselektrophorese (56) und die Kombination von Hochspannungselektrophorese und Homochromatographie (57, 58):

Die zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (54, 55) empfiehlt sich vor allem für die Auftrennung sehr langer Fragmente, da es dafür bisher keine anderen Trennmethode n gleicher Qualität gibt. Sie ist jedoch für die Auftrennung kurzer Oligonukleotide kaum geeignet, da nach der Auftrennung und Elution aus dem Polyacrylamidgel eine Äthanol fällung oder eine Dialyse notwendig ist, was bei kurzen Oligonukleotiden zu erheblichen Verlusten führen kann.

Die Auftrennung durch zweidimensionale Hochspannungselektrophorese (56) auf Celluloseacetat-Streifen (1. Dimension) und DEAE-Papier (2. Dimension) kann nur bei kurzen Oligonukleotiden angewendet werden.

Für die Auftrennung von Oligonukleotiden, die aus Viroid-RNA durch Spaltungen mit RNase T₁ bzw. RNase A erhalten worden waren, erwies sich die Kombination von Hochspannungselektrophorese auf Celluloseacetat-Streifen (1. Dimension) und Homochromatographie auf DEAE-Cellulose-Dünnschichtplatten (2. Dimension) (57, 58) als am besten geeignet. Bei dieser Methode ist auch der zur Isolierung der Fragmente erforderliche Aufwand - Auskratzen des Materials durch Einsaugen der DEAE-Celluloseschicht in kleine 3 x 50 mm Elutionssäulen. Auswaschen von Salzen und Harnstoff mit Äthanol, Elution des ³²P-Oligo-

nukleotids mit 2 M TEAB, Abdampfen des TEAB im Exsikkator - noch erträglich.

Allerdings sind die großen Mengen an RNA aus der Homochromatographielösung, die beim Isolieren der Fragmente mit eluiert werden (bis zu 20 A₂₆₀-Einheiten pro cm² ausgekratzter DEAE-Celluloseschicht) äußerst störend, sofern das isolierte Material anschließend zwecks Sequenzanalyse mit Schlangengiftphosphodiesterase gespalten werden soll. Bedingt durch die hohe RNA-Konzentration werden für diese Spaltung beträchtliche Mengen an Exonuklease notwendig, die dann bei der anschließenden zweidimensionalen Trennung der entstandenen Spaltprodukte über Hochspannungselektrophorese und Homochromatographie eine Verzerrung und starke Vergrößerung der Flecken verursachen.

Es wurde deshalb als ein der Homochromatographie äquivalentes Trennverfahren für Oligonukleotide eine Gradienten-Dünnschichtchromatographie entwickelt, deren Laufmittel keine RNA enthält, die jedoch eine der Homochromatographie vergleichbare, wenn nicht gar identische Auftrennung liefert.

Als Testmaterial für die Ermittlung optimaler Bedingungen bzw. idealer Gradienten dienten verschiedene Hydrolysate von 5S rRNA aus Kaninchenleber. Diese Hydrolysate wurden entweder durch vollständige Spaltung der 5S rRNA mit RNase T₁ oder RNase A erhalten oder durch kontrollierte Spaltung der RNA mit einer unbekannten Nuklease, die als Kontamination in alkalischer Phosphatase aus E. coli enthalten ist (59, 60). Nach Dephosphorylierung der resultierenden Oligonukleotide und ihrer 5'-Phosphorylierung mittels γ -³²P-ATP und T4-Polynukleotidkinase wurden sie auf Celluloseacetat-Streifen elektrophoretisch getrennt und nach der von Southern beschriebenen Technik (61) auf

DEAE-Cellulose-Dünnschichtplatten (20 x 40 cm) überführt. Von diesen eindimensional getrennten Hydrolysaten ausgehend wurde nun mit verschiedenen Laufmitteln versucht, eine möglichst gute und der Homochromatographie vergleichbare dünnschichtchromatographische Fraktionierung in der 2. Dimension zu erreichen.

Es wurden Gradienten solcher Salze getestet, die sich mit Äthanol wieder leicht aus der DEAE-Cellulose eluieren lassen. Voraussetzung für eine gute Auftrennung der Oligonukleotide war in jedem Fall eine möglichst hohe Harnstoffkonzentration in den verwendeten Laufmitteln. Von den getesteten Kombinationen NH_4^+ oder Na^+ mit Formiat oder Acetat erbrachte schließlich Ammonium-Formiat die besten Ergebnisse. Eine Schärfung der Banden wurde schließlich durch Anlegen eines Laufmittel-Gradienten erreicht. Eine für die Gradienten-Dünnschichtchromatographie gebaute Apparatur ist in Abb. 2 wiedergegeben.

Eine Arbeitstemperatur von 65°C verkürzte, im Vergleich zu Raumtemperatur, die Laufzeit auf die Hälfte, d. h. auf ca. 10 h bei einer Plattenhöhe von 40 cm. Diese verkürzte Laufzeit konnte auch die durch die Temperaturerhöhung verstärkte ungerichtete Diffusion der Oligonukleotide kompensieren; d. h. die durch Temperaturerhöhung verkürzte Laufzeit ergab - trotz dadurch erhöhter Diffusionsgeschwindigkeit - kleine und scharfe Flecken.

Tabelle 1 zeigt die für die Trennung unterschiedlich langer Oligonukleotide als optimal ermittelten Gradienten und Homochromatographielösungen entsprechender Leistung.

Zwei Beispiele für die Auftrennung mittels des Gradienten I (s. Tab. 1) zeigt die Abb. 3. Die auf diese Weise, also durch Gradienten-Dünnschichtchromatographie erhaltenen

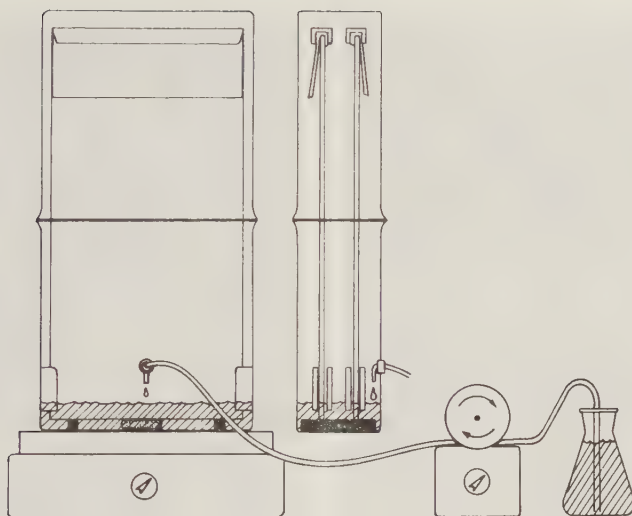


Abb. 2: Apparatur für die Gradienten-Dünnschicht-chromatographie:
Eine Dünnschichtkammer mit seitlichen Rippen und einer 3mm weiten Bohrung an einer Seite enthält, auf einem Magnetrührer stehend, 120 ml des weniger konzentrierten Laufmittels. In der Kammer befinden sich 20 x 40 cm DEAE-Cellulose-Platten, an deren oberem Ende mittels einer Schiene Whatman 3MM-Papier als Docht befestigt ist. Die Platten stehen auf zwei 4 x 4 x 65 mm Plastikstäbchen, um ein Mischen des Laufmittels durch den Magneten zu ermöglichen. Eine zweite, jedoch ungerippte Kammer dient als Deckel.
Das höher konzentrierte Fließmittel (120 ml) wird aus dem Vorratsbehälter mit einer regulierbaren Peristaltikschlauchpumpe innerhalb eines Zeitraums von 10 h dazugetropft. Der Magnetrührer mit der Dünnschichtkammer steht in einem 65°C-Heizschrank. Falls die Apparatur bei Raumtemperatur eingesetzt wird, muß das konzentriertere Fließmittel innerhalb von 20 h zugetropft werden.

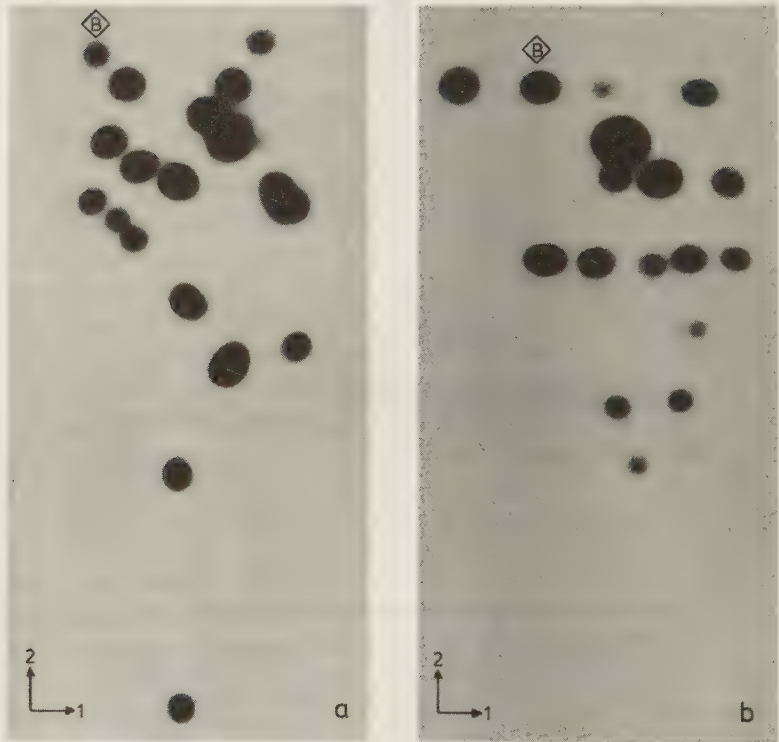


Abb. 3: Fingerprints einer RNase T₁ (a) - und einer RNase A (b) - Spaltung von ¹5S rRNA aus Kaninchenleber.

1. Dimension: Hochspannungselektrophorese auf Celluloseacetat-Streifen, pH 3,5.

2. Dimension: Gradienten-Dünnschichtchromatographie an DEAE-Cellulose mit Gradient I (Tab. 1): Fließmittel im Tank: 120 ml 0,25 M NH₄-Formiat, 9 M Harnstoff, 1 mM Na₂EDTA, pH 5,5; ⁴Fließmittel im Vorratsgefäß: 0,45 M NH₄-Formiat, 9 M Harnstoff, 1 mM Na₂EDTA, pH 5,5.

B = Lage des blauen Farbstoffs Xylen-Cyanol.

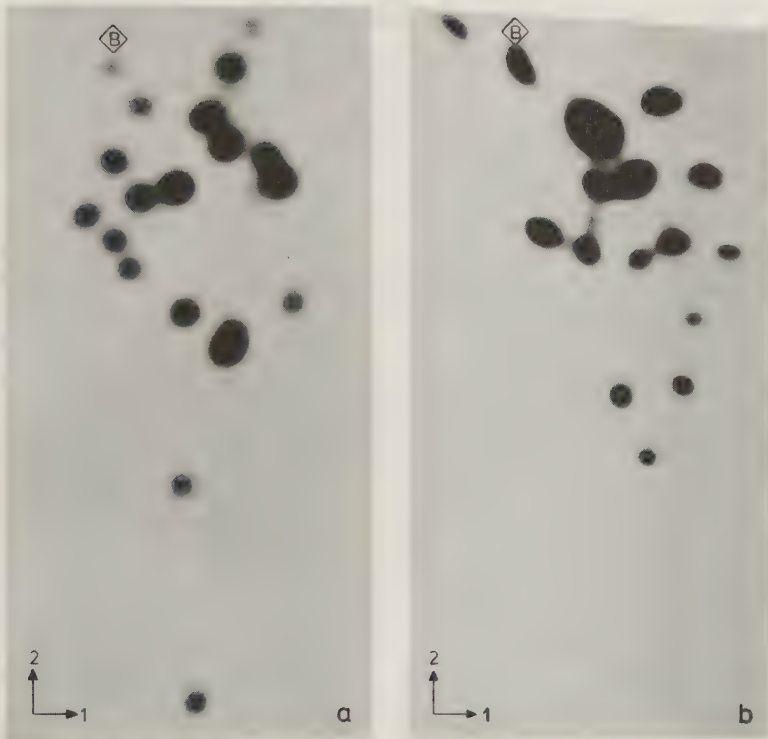


Abb. 4: Fingerprints einer RNase T₁ (a) - und RNase A (b) - Spaltung von 5S rRNA₁ aus Kaninchenleber.
1. Dimension: Hochspannungselektrophorese auf Celluloseacetat-Streifen, pH 3,5.
2. Dimension: Homochromatographie in einer 50 mM KOH - Homochromatographielösung.
B = Lage des blauen Farbstoffs Xylen-Cyanol.

Fingerprints besitzen eine außerordentliche Ähnlichkeit mit den in Abb. 4 gezeigten, die mittels einer 50 mM KOH - Homochromatographielösung erhalten wurden.

Abb. 5 zeigt zwei Auftrennungen von 5S rRNA - Fragmenten, die durch eine kontrollierte Spaltung mit einer unbekannten Nuklease, die in bakterieller alkalischer Phosphatase enthalten ist, erzeugt wurden (59, 60). Diese Trennungen wurden mit dem Gradienten III (s. Tab. 1) und, zum Vergleich, mit einer 1 mM KOH - Homochromatographielösung durchgeführt. Die Abbildung dokumentiert zwar die Gleichwertigkeit beider Methoden, macht aber andererseits bereits deutlich, daß weder das eine noch das andere Verfahren für die Auftrennung längerer RNA-Fragmente ideal ist (vgl. dazu die gute Auftrennung des gleichen 5S rRNA - Hydrolysats mittels zweidimensionaler Polyacrylamidgelelektrophorese in Abb. 7).

Ein Beispiel für die Auftrennung durch den Gradienten II (s. Tab. 1) wird später in Abb. 14 gezeigt.

A	B	C
1 - 12	0,25 M - 0,35 M (I)	50 mM KOH
1 - 20	0,3 M - 0,45 M (II)	30 mM KOH
5 - 40	0,4 M - 0,6 M (III)	1 mM KOH

Tab. 1: Vergleich von Laufmitteln für die Gradienten-Dünnschicht- und die Homochromatographie:
Für die Auftrennung von Oligonukleotiden unterschiedlicher Kettenlänge (A, Anzahl der Nukleotide) erwiesen sich Ammonium-Formiat-Gradienten in 1 mM Na₂EDTA, 9 M Harnstoff, pH 5,5 (B) als praktisch äquivalent zur Homochromatographie in entsprechenden Homochromatographielösungen, die durch die für die Hydrolyse der Nukleinsäure verwendeten KOH-Konzentrationen charakterisiert sind (C).

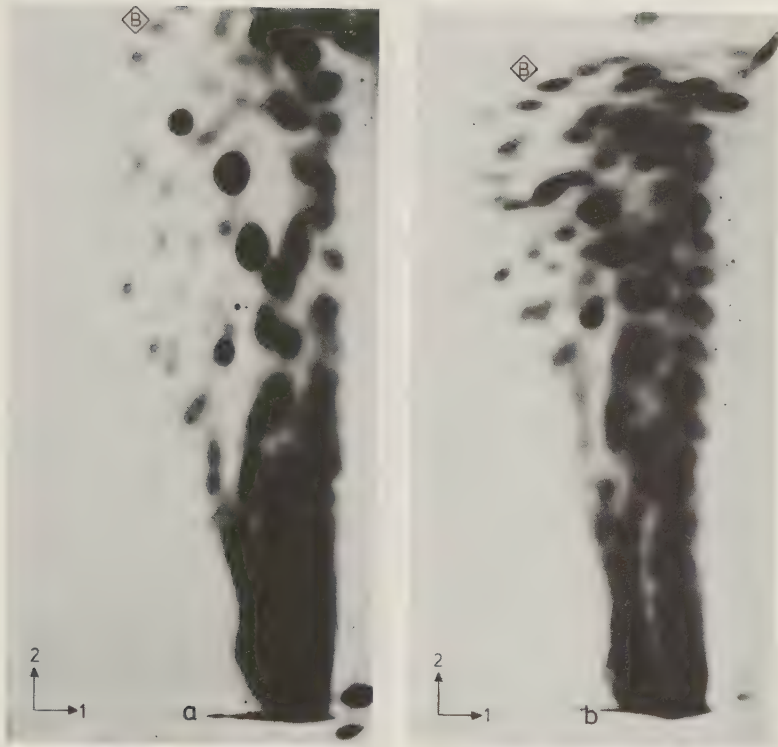


Abb. 5: Fingerprints einer kontrollierten Spaltung von 5S rRNA aus Kaninchenleber mit einer unbekannten Nuklease aus alkalischer *E. coli*-Phosphatase.

1. Dimension: Hochspannungselektrophorese auf Celluloseacetat-Streifen, pH 3,5.

2. Dimension: (a), Gradienten-Dünnschichtchromatographie an DEAE-Cellulose mit Gradient III (Tab. 1); Fließmittel im Tank: 120 ml 0,4 M NH_4 -Formiat, 9 M Harnstoff, 1 mM Na_2EDTA , pH 5,5; Fließmittel im Vorratsgefäß: 0,8 M NH_4 -Formiat, 9 M Harnstoff, 1 mM Na_2EDTA , pH 5,5.

(b), Homöchromatographie mit einer 1 mM KOH - Homöchromatographielösung.

B = Lage des blauen Farbstoffs Xylen-Cyanol.

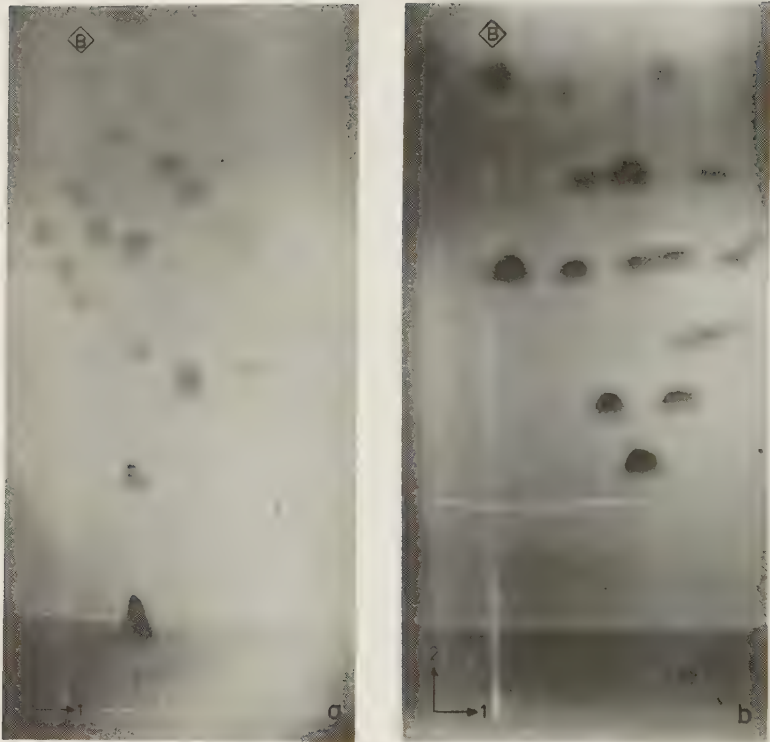


Abb. 6: Oligonukleotidmuster einer RNase T₁ (a) - und einer RNase A (b) - Spaltung von je 5 A₂₆₀-Einheiten 5S rRNA aus Kaninchenleber. Die Auftrennung entspricht der in Abb. 3. Die Platten wurden unter UV-Licht der Wellenlänge 254 nm mit einem Kodak Ektachrome 64 ASA Diafilm fotografiert. Die Diapositive wurden auf einen Agfaortho 25 ASA Schwarzweißfilm mit Hilfe eines extrem harten Entwicklers umkopiert; von diesen Negativen wurden die abgebildeten Positive (a) und (b) angefertigt.

Statt der DEAE-Cellulose-Dünnschichtplatten wurden auch Polyäthylenimin-Cellulose-Dünnschichtplatten getestet: Diese waren jedoch für die Auftrennung von mittels T4-Polynukleotidkinase 5'-markierten Oligonukleotiden ungeeignet, da das im Reaktionsgemisch vorhandene Glucose-6-Phosphat nicht als einheitliche Bande wanderte, sondern sich über die gesamte Laufstrecke verschmierte.

Neben der Auftrennung radioaktiv markierten Materials bietet sich die Gradienten-Dünnschichtchromatographie natürlich auch für die Auftrennung unmarkierter Oligonukleotide an. Abb. 6 zeigt die RNase T₁ - und RNase A - Spaltmuster von jeweils 5 A₂₆₀-Einheiten 5S rRNA, wie sie nach Hochspannungselektrophorese auf Cellogel-Streifen und Gradienten-Dünnschichtchromatographie mit Gradient I (s. Tab. 1) im UV-Licht von 254 nm Wellenlänge sichtbar wurden.

3.1.3. Sequenzanalyse von RNA im Nanogramm-Bereich durch eine Kombination von in vitro 5'-³²P- Markierungen (53)

Die Sequenzanalyse von RNA mittels des von Donis-Keller et al. (46) entwickelten Verfahrens auf Polyacrylamid-gelen erbringt wegen verschiedener Schwierigkeiten nicht immer eindeutige Ergebnisse:

Zum einen liegt die Ursache in bandenfreien Regionen oder ungewöhnlichen Abständen zwischen einzelnen Banden auf den Sequenzgelen, bedingt durch die Bildung von Haarnadelstrukturen ("hairpins") oder die Dimerisierung entsprechender Oligonukleotide (47, 62); zum anderen ist es immer noch problematisch, auf den Sequenzgelen Cytidine und Uridine voneinander zu unterscheiden (49 - 51), trotz Verwendung eines Enzyms aus Physarum polycephalum, genannt RNase Phy I. das alle Phosphodiesterbindungen außer die an der 3'-Seite von Cytidinen spalten soll (32, 48).

Es wurde deshalb eine Methode entwickelt, die durch eine Kombination zweier aufeinanderfolgender ("primärer" und "sekundärer") in vitro 5'-³²P-Markierungen die mit der schnellen RNA-Sequenzanalyse nach Donis-Keller et al. (46) verbundenen Probleme zu umgehen vermag. Dieses Verfahren ist methodisch und in seinen Ergebnissen den Fingerprint- und Sequenziertechniken für in vivo markierte RNA äquivalent (56), kann jedoch auch bei Ribonukleinsäuren angewendet werden, welche in vivo nur äußerst schlecht mit ³²P markiert werden können, wie es zum Beispiel bei Viroiden der Fall ist (35, 60).

Die Methode wurde zunächst an 5S rRNA aus Kaninchenleber entwickelt und erprobt.

5 µg RNA wurden mit einer Nuklease, die als Kontamination in kommerzieller alkalischer Phosphatase enthalten ist (59,



Abb. 7: Kontrollierte Spaltung von 5 μ g 5S rRNA aus Kaninchenleber mit einer unbekannten Nuklease aus kommerzieller alkalischer *E. coli*-Phosphatase. Die resultierenden Fragmente wurden nach 5'-Endgruppenmarkierung durch zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese getrennt (55, 63).
1. Dimension: 10 % Polyacrylamid, 7 M Harnstoff, pH 3,5;
2. Dimension: 20 % Polyacrylamid, 7 M Harnstoff, pH 8,3.
Die numerierten Flecken wurden ausgeschnitten und die Oligonukleotide elektrophoretisch eluiert.
X = Lage des blauen Farbstoffs Xylen-Cyanol.

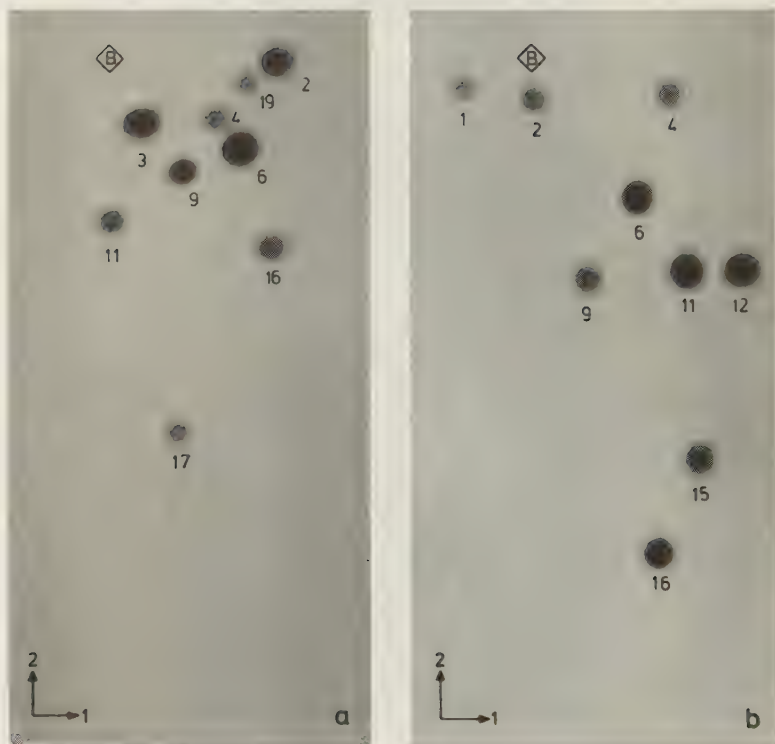


Abb. 8: Autoradiogramme 5'-³²P-markierter Oligonukleotide, die nach vollständiger Spaltung und anschließender "sekundärer" Phosphorylierung des 5'-³²P-markierten Fragments Nr. 5 (s. Abb. 7) mit RNase T₁ (a) bzw. RNase A (b) erhalten wurden. 1. Dimension: Hochspannungselektrophorese (5000 V) auf Celluloseacetat-Streifen, pH 3,5; 2. Dimension: Homochromatographie in einer 50 mM KOH - Homochromatographielösung auf DEAE-Cellulose-Dünnschichtplatten. Die Numerierung der Oligonukleotide entspricht der in Abb. 10. B = Lage des Xylen-Cyanol-Farbstoffs.

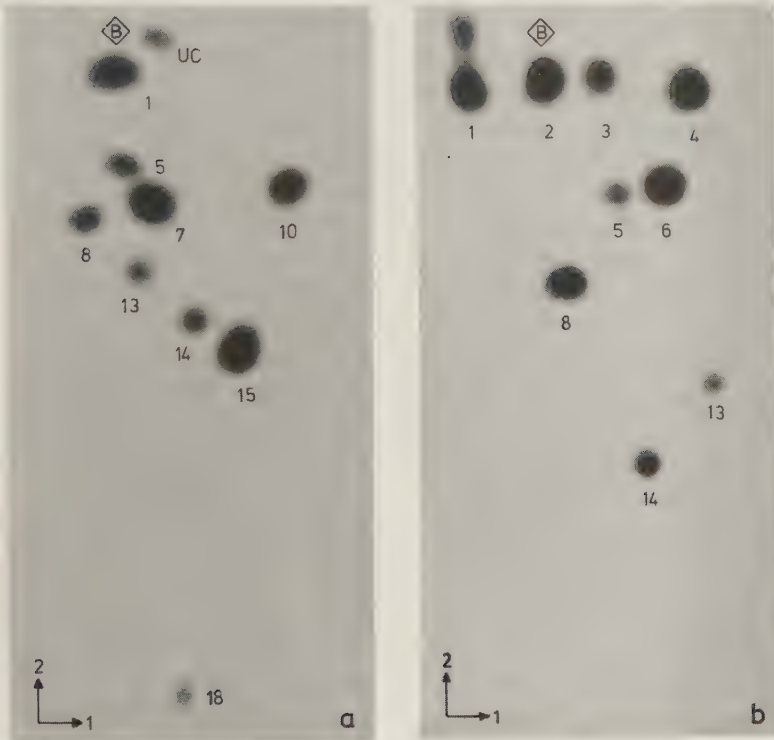


Abb. 9: Autoradiogramme 5'-³²P-markierter Oligonukleotide, die nach vollständiger Spaltung des 5'-³²P-markierten Fragments Nr. 8 (s. Abb. 7) mit RNase T₁ (a) bzw. RNase A (b) erhalten wurden. Auftrennung wie in Abb. 8; die Numerierung der Oligonukleotide entspricht der in Abb. 10. B = Lage des Xylen-Cyanol-Farbstoffs.

60), partiell, d. h. unter limitierenden Bedingungen, gespalten (Rezept AP, Tab. 6). Die resultierenden langen Fragmente wurden nach Inaktivierung der Phosphatase (31) mit Äthanol gefällt, anschließend mit T4-Polynukleotid-kinase in vitro 5'-³²P-phosphoryliert (31, 60) und durch zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (55, 63) aufgetrennt (Abb. 7). Die numerierten Flecken wurden ausgeschnitten und die Oligonukleotide elektrophoretisch eluiert (64), wobei jedoch keine RNA im Dialyseschlauch vorgegeben wurde. Nach Dialyse gegen Wasser und Einengen zur Trockene wurden Aliquote jeweils mit RNase T₁ bzw. RNase A vollständig gespalten. Der Phosphatase-Behandlung mit anschließender Inaktivierung der Phosphatase folgte wiederum eine 5'-³²P-Markierung der entstandenen Oligonukleotide. Diese wurden zweidimensional durch Hochspannungselektrophorese auf Celluloseacetat-Streifen (1. Dimension) und Homochromatographie auf DEAE-Cellulose-Dünnschichtplatten (2. Dimension) aufgetrennt. Die Abbildungen 8 und 9 zeigen vier entsprechende Autoradiogramme.

Beim Vergleich dieser Fingerprints mit solchen von vollständiger 5S rRNA (in Abb. 10 schematisch dargestellt) kann man deutlich erkennen, daß die Oligonukleotid-Muster der gespaltenen Partialfragmente nur einen Teil aller 5S rRNA - Oligonukleotide enthalten: Fragment Nr. 8 enthält alle Oligonukleotide von Nukleotid 1 bis 63 (s. Abb. 11, schwarzer Pfeil) der 5S rRNA; Fragment Nr. 5 umfaßt alle Oligonukleotide von Nukleotid 74 (s. Abb. 11, weißer Pfeil) bis Nukleotid 120, dem 3'-Ende der 5S rRNA.

Die partielle Spaltung von 5S rRNA unter den beschriebenen kontrollierten Bedingungen lieferte etwa 50 lange Fragmente (Abb. 7). Dabei dürfte sich die RNA-Menge pro starkem Fleck in Abb. 7 im 10 ng - Bereich bewegen.

Diese Schätzung beruht auf einem Vergleich mit Fingerprints, die mit abnehmenden Mengen von RNase T₁ - Hydrolysaten von 5S rRNA (10 ng, 2,5 ng, 1,0 ng, 0,2 ng RNA) angefertigt wurden. Hier hatten nämlich diejenigen Fingerprints, die mit 10 ng 5S rRNA erstellt worden waren, eine vergleichbare Intensität und Qualität. Es zeigte sich ebenfalls, daß sogar noch ein Hydrolysat aus 1 ng

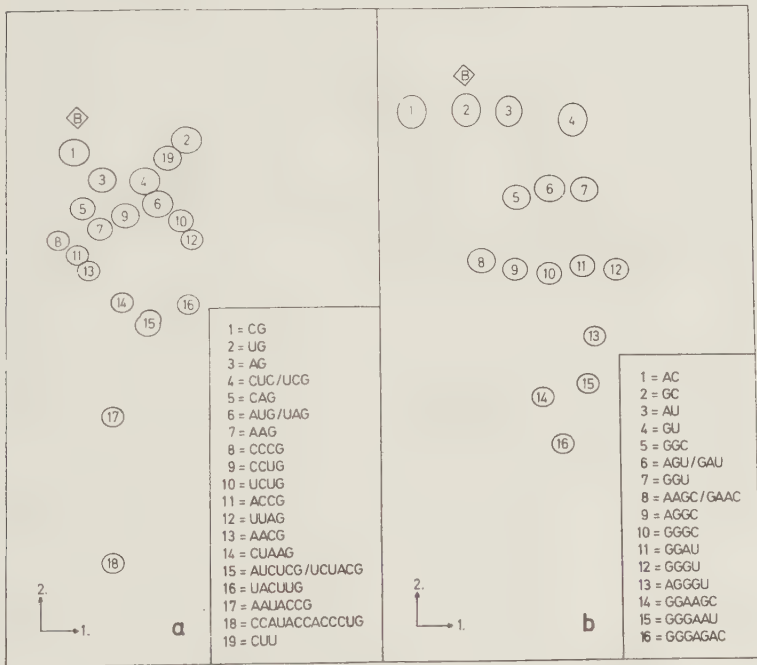


Abb. 10: Schematische Darstellung der Fingerprints der vollständigen RNase T₁ (a) - und RNase A (b) - Spaltungen von Kaninchenleber - 5S rRNA. Die zweidimensionale Auftrennung entspricht der in Abb. 8.

5S rRNA genügte, um Fingerprints durchaus akzeptabler Qualität zu liefern - im Gegensatz zu 200 pg Material.

Die an 5S rRNA erarbeitete und erprobte Methode wurde auch bei der Sequenzanalyse langer PSTV-Partialfragmente eingesetzt, wofür sie ja entwickelt worden war. Sie erwies sich dabei nicht nur als wertvolle, sondern oft auch unverzichtbare Ergänzung zu den Sequenzermittlungen



Abb. 11: Struktur von Kaninchenleber - 5S rRNA nach Labrie und Sanger (65) und Hori (66). Die Pfeile markieren zwei von mehreren Schnittstellen, die durch eine unbekannte Nuklease erzeugt worden sind, die in bakterieller alkalischer Phosphatase enthalten ist. Fragment Nr. 8 (s. Abb. 9) enthält die Nukleotide vom 5'-Ende bis zum schwarzen Pfeil; Fragment Nr. 5 (s. Abb. 8) umfaßt die Sequenz ausgehend vom weißen Pfeil bis zum 3'-Ende der 5S rRNA.

mittels Polyacrylamidgelelektrophorese, denn sie wird nicht durch Sekundärstruktureffekte, wie sie nicht selten bei langen RNA-Fragmenten auftreten (47, 62), beeinträchtigt. Auf diese Weise wurde in einigen Fällen die vorher nicht verfügbare, zur Aufklärung der Sequenz jedoch notwendige Information erarbeitet.

3.2. Sequenzanalyse von PSTV

3.2.1. Vollständige Spaltungen von PSTV, 5'-Phosphorylierung, Auftrennung, Sequenzierung und Stöchiometrie der Spaltprodukte (60, 67)

Der erste Schritt zur Ermittlung der Primärstruktur von PSTV bestand darin, die Viroid-RNA durch vollständige enzymatische Spaltung in kleinere, definierte Bruchstücke zu zerlegen und anschließend deren Sequenz zu bestimmen.

3.2.1.1. Vollständige Spaltung mit Ribonuklease T₁ bzw. Ribonuklease A, 5'-³²P-Markierung und Auftrennung der erhaltenen Oligonukleotide

Die Ribonukleasen T₁ und A dienten als spezifische Katalysatoren für die vollständige Spaltung der Viroid-RNA, wobei "vollständig" bedeutet, daß die jeweilige Ribonuklease die RNA tatsächlich an jeder ihrer möglichen spezifischen Schnittstellen spaltete.

Die Spezifität der RNase T₁ liegt dabei in der Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen auf der 3'-Seite von Guanosin und einigen seiner Derivate. Es entstehen Oligonukleotide mit einer freien 5'-Hydroxylgruppe, die am 3'-terminalen Ende stets ein Guanosin-3'-Phosphat tragen; aus benachbarten Guanosinen wird Guanosin-3'-Phosphat gebildet.

Ribonuklease A ist pyrimidinspezifisch und spaltet auf der 3'-Seite von Cytidin, Uridin und Pyrimidin-Derivaten, wobei Oligonukleotide mit 3'-ständigem Pyrimidinphosphat neben Pyrimidin-3'-Monophosphaten entstehen.

Eine anschließende Behandlung der erhaltenen Spaltprodukte mit alkalischer Phosphatase aus E. coli oder aus Kälberdarm zwecks Entfernung der 3'-ständigen Phosphate erwies sich als unumgänglich: 5'-Polynukleotidkinase aus T4 Phagen - infizierten E. coli hat zwar neben ihrer

5'-Kinase-Aktivität zusätzlich auch 3'-Phosphatase-Aktivität; diese ist auch ausreichend, längere Oligonukleotide (ab einer Kettenlänge von ca. 5 Nukleotiden) an ihrem 3'-Ende quantitativ zu dephosphorylieren, jedoch wurden kurze Fragmente nicht quantitativ dephosphoryliert und daher nicht homogen, sondern als Gemisch von 3'-OH- und 3'-Phosphat-Oligonukleotiden erhalten.

Cameron und Uhlenbeck (68) haben diese 3'-Phosphatase-Aktivität genauer untersucht und vermuten, daß diese gemeinsam auftretenden 3'-Phosphatase- und Polynukleotidkinase-Aktivitäten Funktionen ein und desselben Proteinmoleküls sind. Da ihren Ergebnissen zufolge ATP die 3'-Phosphatase-Aktivität des Enzyms hemmt, könnte dies eine Erklärung für die unvollständige Dephosphorylierung von kurzen Oligonukleotiden sein.

Die Ausbeute an 5'-³²P-markierten Oligonukleotiden nach 5'-Phosphorylierung mittels γ -³²P-ATP und T4-Polynukleotidkinase (31, 69) konnte durch Zugabe von Spermin (1,7 mM) zum Phosphorylierungsansatz um den Faktor 1,6 - 2,0 verbessert werden. Ersatz des Mercaptoäthanol durch Dithiotreitol und/oder Zugabe von Rinderserumalbumin verbesserten die Ergebnisse weder qualitativ noch quantitativ.

Abb. 12 zeigt die RNase T₁ - und RNase A - Fingerprints von PSTV-tom, d. h. die Autoradiogramme, welche im Anschluß an RNase T₁ - bzw. RNase A - Verdauung, Behandlung mit alkalischer Phosphatase, deren Inaktivierung, 5'-Phosphorylierung und zweidimensionaler Auftrennung erhalten wurden.

5'-Polynukleotidkinase-Fingerprints einer PSTV-Fraktion aus dem Nachtschattengewächs Scopolia sinensis von Singh et al. (70) sind von so schlechter Qualität, daß keine Ähnlichkeit mit den hier gezeigten PSTV-Fingerprints erkennbar ist.

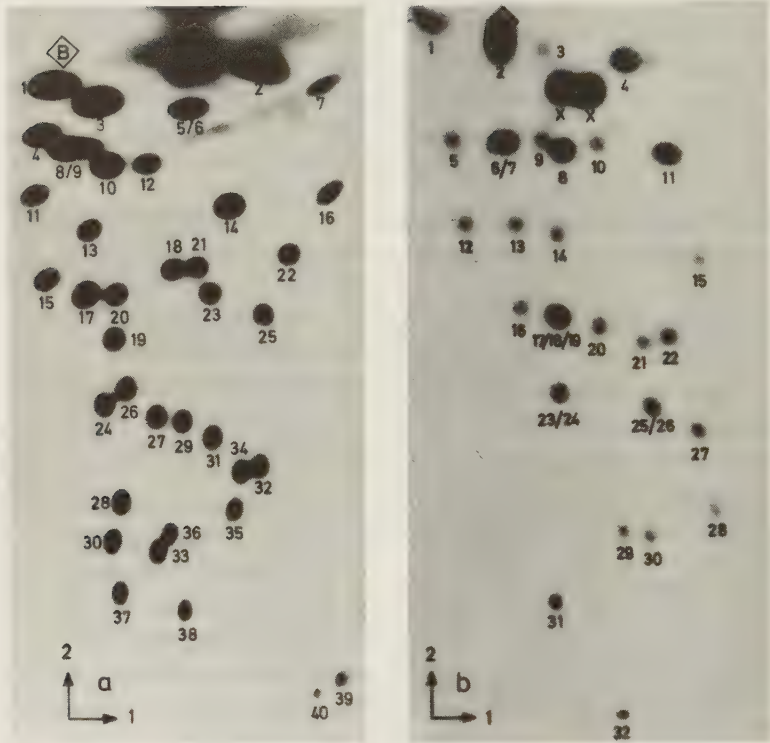


Abb. 12: Autoradiogramme der 5'-³²P-markierten Oligonukleotide, die nach vollständiger Spaltung von PSTV mit RNase T₁ (a) bzw. RNase A (b) und anschließender zweidimensionaler Auftrennung erhalten wurden.

1. Dimension: Elektrophorese auf Cellulose-acetat-Streifen, pH 3,5.

2. Dimension: Homochromatographie in einer 30 mM KOH - Homochromatographielösung auf DEAE-Cellulose-Dünnschichtplatten. Die Sequenzen und molaren Verhältnisse der Oligonukleotide sind in Tab. 3 aufgeführt.

X = unidentifizierte Nukleosid-3',5'-Diphosphate.

B = Lage des blauen Farbstoffs Xylen-Cyanol; in der rechten Abbildung koinzidiert dieser mit Oligonukleotid 2.

Nr.	A	a	b	c	Nr.	B	a	b	c
T-1	CG	6,4	6	7	A-1	AC	6,7	7	7
T-2	UG	7,3	7	7	A-2	GC	13,1	13	13
T-3	AG	8,0	8	8	A-3	AU	1,0	1	1
T-4	CCG	2,0	2	2	A-4	GU	5,9	6	5
T-5	CUG	1,2	1	1	A-5	AAC	0,9	1	1
T-6	UCG	1,2	1	1	A-6	AGC	1,7	2	2
T-7	UUG	1,0	1	1	A-7	GAC	2,0	2	2
T-8	CAG	2,7	3	3	A-8	GGC	3,1	4	4
T-9	ACG	0,9	1	1	A-9	AAU	1,0	1	1
T-10	AAG	2,1	2	2	A-10	AGU	1,4	1	1
T-11	CCC	1,2	1	1	A-11	GGU	4,2	5	5
T-12	CUC	1,1	1	1	A-12	AAAC	1,0	1	1
T-13	ACAG	0,9	1	1	A-13	GAAC	0,8	1	1
T-14	CUUCG	2,2	2	2	A-14	GAGC	0,8	1	1
T-15	CCCAG	0,8	1	1	A-15	GGGU	0,6	1	1
T-16	UUUAG	1,1	1	1	A-16	GAAAC	0,7	1	1
T-17	AACCG	1,7	2	2	A-17	AGGAC	0,7	1	1
T-18	AACUG	0,8	1	1	A-18	GAGC	0,5	1	1
T-19	AAAAG	1,0	1	1	A-19	GGAAC	1,4	2	2
T-20	CUCCCG	1,0	1	1	A-20	GGAGC	0,7	1	1
T-21	CCCUUG	0,7	1	1	A-21	GGGGC	0,3	1	1
T-22	UUCCUG	0,9	1	1	A-22	AGGGU	0,6	1	1
T-23	CUUCAG	0,9	1	1	A-23	GAGAAC	0,6	1	1
T-24	AAACAG	0,8	1	1	A-24	GGAAAC	0,6	1	1
T-25	UUCUCG	0,7	1	1	A-25	AGGAGU	0,5	1	1
T-26	AUCCCG	0,8	1	1	A-26	AGGGAU	0,5	1	1
T-27	AAACCUG	1,0	1	1	A-27	GAGGGU	0,4	1	1
T-28	AAAAAAG	1,1	1	1	A-28	GGGGAGU	0,2	1	1
T-29	ACCUCUG	0,8	1	1	A-29	GGGGAAAC	0,3	1	1
T-30	CAAAAAAG	1,0	1	1	A-30	GGGGAGC	0,2	1	1
T-31	CCCCUUUG	0,9	1	1	A-31	AAAAAAGGAC	0,6	1	1
T-32	UAAUCCCG	0,8	1	1	A-32	AGAAAAAGAAA-			
T-33	AAACAACUG	0,9	1	1		AAAGAAGGC	0,1	1	1
T-34	UCCUCCUG	0,8	1	1					
T-35	UUCACACUG	0,7	1	1					
T-36	CUACUACCG	0,7	1	1					
T-37	ACCACCCUG	0,8	1	1					
T-38	AACUAAACUG	0,6	1	1					
T-39	CUUUUUCUCU-								
	AUCUUACUUG	0,7	1	1					
T-40	UUUUCACCU-								
	UCCUUUCUUG	0,6	1	1					

Tab. 2: Sequenzen und molare Verhältnisse der Oligonukleotide, die nach vollständiger Spaltung von PSTV mit RNase T₁ (A) oder RNase A (B), Dephosphorylierung, 5'-32P-Phosphorylierung und zweidimensionaler Trennung erhalten wurden.
(a): Unkorrigierte molare Verhältnisse, ermittelt durch Čerenkov-Zählung der aus verschiedenen unabhängigen Fingerprints isolierten Oligonukleotide.
(b): Korrigierte molare Verhältnisse; diese wurden wie im Text beschrieben ermittelt.
(c): Tatsächliche molare Verhältnisse, wie sie sich aus der Gesamtsequenz von PSTV (Abb. 35) ergaben.

Die zweidimensionale Auftrennung der Oligonukleotide bestand in einer Elektrophorese bei pH 3,5 und 5000 V auf Celluloseacetat-Streifen (1. Dimension) und einer Homochromatographie bei 65 °C auf 20 x 40 cm DEAE-Cellulose-Dünnschichtplatten mit einer 30 mM KOH - Homochromatographielösung als Laufmittel (2. Dimension). In den gezeigten Fingerprints der Abb. 12 war die Laufstrecke des blauen Farbstoffs Xylen-Cyanol in der 1. Dimension 11 cm (RNase T₁ - Verdauung) bzw. 9 cm (RNase A - Verdauung), in der 2. Dimension in beiden Fällen ca. 35 cm.

Um die Auftrennung einiger Oligonukleotide, wie zum Beispiel A-6/7 oder A-17/18/19, zu verbessern bzw. überhaupt erst zu ermöglichen, wurde die Dauer der Elektrophorese, d. h. die Laufstrecke des Xylen-Cyanol-Farb-

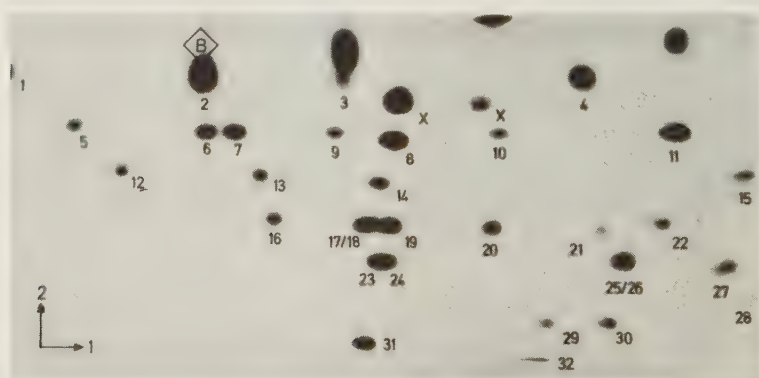


Abb. 13: Fingerprint einer RNase A - Spaltung von PSTV. 1. Dimension: Verlängerte Elektrophorese auf Celluloseacetat-Streifen, pH 3,5; Laufstrecke des Xylen-Cyanol-Farbstoffs = 20 cm. 2. Dimension: Homochromatographie in einer 50 mM KOH - Homochromatographielösung. Die Beschriftung entspricht der in Abb. 12. B = Lage des blauen Xylen-Cyanol-Farbstoffs.

stoffs, erheblich verlängert. Abb. 13 zeigt dazu einen RNase A - Fingerprint von PSTV, bei dem die Laufstrecke von Xylen-Cyanol 20 cm betrug. Anschließend wurde für die Auftrennung in der 2. Dimension auf die Längsseite einer DEAE-Cellulose-Dünnschichtplatte übertragen und - im Querformat - in einer 50 mM KOH - Homochromatographie-lösung entwickelt.

Noch bessere Trennungen einiger koinzidierender Oligonukleotide, zum Beispiel von A-25/26, wurden auf 1 m langen Celluloseacetat-Streifen mit Xylen-Cyanol-Laufstrecken bis zu 50 cm erreicht.

Da die Kapazität der Celluloseacetat-Streifen nur gering ist, wurden für die Auftrennung größerer Substanzmengen statt dessen Cello-gel-Streifen benutzt, wodurch Vergrößerung und Verschmieren der Flecken vermieden werden konnten.

Zur dünnschichtchromatographischen Auftrennung der Oligonukleotide in der 2. Dimension diente im allgemeinen die Homochromatographie an DEAE-Cellulose mit einer durch 30 mM KOH angefertigten Homochromatographielösung als Laufmittel. Der hohe Anteil an RNA-Hydrolysat aus der Homochromatographielösung, welcher nach der Auftrennung an die DEAE-Cellulose der Dünnschichtplatte gebunden war und folglich bei der Isolierung der Oligonukleotide auch mit-eluiert wurde, wirkte sich bei der späteren partiellen Spaltung der Oligonukleotide mit Nuklease P_1 zum Zweck der Sequenzermittlung der Fragmente im allgemeinen nicht störend aus. War es jedoch notwendig, Schlangengiftphosphodiesterase statt Nuklease P_1 einzusetzen, dann erwiesen sich die hohen RNA-Mengen als äußerst nachteilig, denn dadurch wurden große Mengen an Schlangengiftphosphodiesterase notwendig, die bei der anschließenden zweidimensionalen Trennung eine starke Vergrößerung der Flecken verursachten.

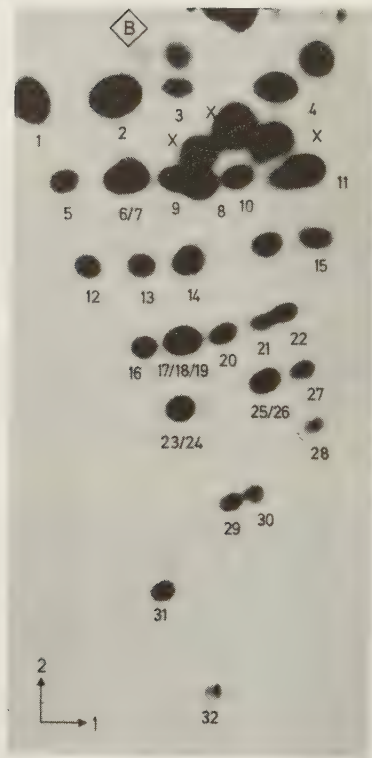


Abb. 14: Fingerprint einer RNase A - Spaltung von PSTV.
 1. Dimension: Elektrophorese auf Cellulose-
 acetat-Streifen, pH 3,5.
 2. Dimension: Gradienten-Dünnschichtchromato-
 graphie an DEAE-Cellulose mit Gradient II
 (s. Tab. 1). Fließmittel im Tank: 120 ml
 0,3 M NH_4 -Formiat, 9 M Harnstoff, 1 mM Na_2EDTA ,
 pH 5,5; ⁴ dazugetropftes Fließmittel: 0,6 M
 NH_4 -Formiat, 9 M Harnstoff, 1 mM Na_2EDTA ,
 pH 5,5.
 Die Beschriftung entspricht der in Abb. 12.

Deshalb wurde als Alternative zur Homochromatographie die bereits beschriebene Gradienten-Dünnschichtchromatographie entwickelt (52), die es gestattete, RNA-freie 5'-³²P-markierte Oligonukleotide zu isolieren. Die Gleichwertigkeit dieses Verfahrens mit dem der Homochromatographie, auch bei der Auftrennung von Viroid-RNA-Oligonukleotiden, zeigt in Abb. 14 ein auf diese Weise erstellter Fingerprint einer RNase A - Spaltung von PSTV.

3.2.1.2. Sequenzierung der rein isolierten Oligonukleotide

Nach dem Isolieren der Fragmente durch Auskratzen der DEAE-Cellulose, Auswaschen der Salze und des Harnstoffs mit Äthanol, Elution der RNA mit 2 M TEAB und Entfernen des Puffers standen die 5'-³²P-markierten Oligonukleotide direkt zum Sequenzieren zur Verfügung.

Als erster Schritt wurde bei allen Fragmenten eine 5'-Endgruppenbestimmung durchgeführt: Nach vollständiger Spaltung der Fragmente in 5'-Mononukleotide mit Nuklease P₁ wurden die erhaltenen Hydrolysate zusammen mit den authentischen 5'-Mononukleotiden pA, pC, pG und pU dünn-schichtchromatographisch aufgetrennt. Da nach der Spaltung nur das 5'-ständige Nukleotid des gespaltenen Oligonukleotids die radioaktive Markierung trägt, konnte dieses durch Autoradiographie identifiziert werden (Abb. 15).

Diese 5'-Endgruppenbestimmung ist insofern wichtig und notwendig, als sie zum einen Hinweise auf die Reinheit und Homogenität des isolierten Materials liefert: Stöchiometrisches Auftreten verschiedener 5'-³²P-Mononukleotide bedeutet, daß das isolierte Material mehrere Fragmente enthält, die jedoch gleiche elektrophoretische und homochromatographische Laufeigenschaften besitzen; nichtstöchiometrisches Vorhandensein eines

oder mehrerer zusätzlicher 5'-³²P-Mononukleotide in geringen Mengen läßt darauf schließen, daß das isolierte Material nicht ganz rein ist.

Zum anderen ist die Kenntnis des 5'-ständigen Nukleotids eine notwendige Voraussetzung für die sich anschließende Sequenzierung des Fragments: Erst aus der 5'-Endgruppe und der Lage des vollständigen Fragments im Fingerprint lassen sich die Laufstrecken der Abbauprodukte des Oligonukleotids bei der Hochspannungselektrophorese auf Celluloseacetat-Streifen abschätzen. Dies ist die Voraussetzung für ein korrektes Übertragen vom Celluloseacetat-Streifen, auf dem das partielle P₁-Hydrolysat des Fragments in der 1. Dimension aufgetrennt werden soll, auf die DEAE-Cellulose-Dünnschichtplatte, auf der die Auftrennung in der 2. Dimension stattfindet.

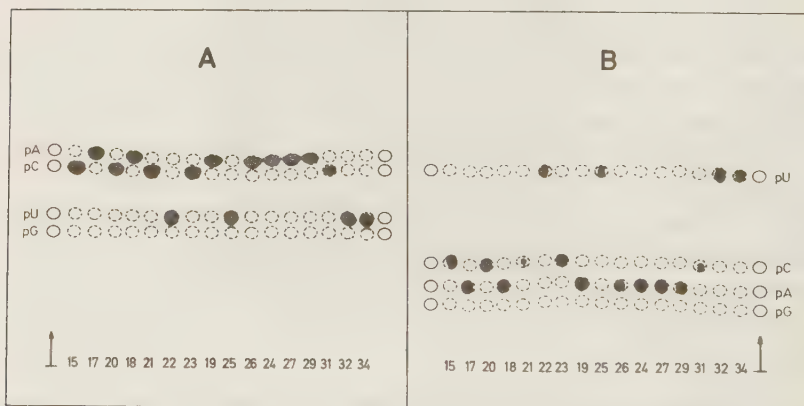


Abb. 15: 5'-Endgruppenanalyse einiger Fragmente aus dem RNase T₁ - Fingerprint (Numerierung wie in Abb. 12¹ und Tab. 2). Die Auftrennung der vollständigen P₁-Hydrolysate erfolgte in Laufmittel A (Isobuttersäure : konz. NH₃ : H₂O, pH 4,3, 577 : 38 : 385) und in Laufmittel² B (t-Butanol : konz. HCl : H₂O, 14 : 3 : 3). ³²P-Mononukleotid (lokalisiert durch Autoradiographie) und authentischem Material (punktiert, sichtbar im UV-Licht) gilt als Hinweis auf Identität.

Es soll bereits hier erwähnt werden, daß keines der untersuchten 5'-Nukleotide eine Modifikation trug.

Die eigentliche Sequenzanalyse der 5'-³²P-markierten Oligonukleotide wurde mittels zweier Verfahren durchgeführt: Die durch kontrollierte Spaltung mit Nuklease P₁ oder Schlangengiftphosphodiesterase erhaltenen Abbauprodukte eines Oligonukleotids wurden entweder eindimensional auf DEAE-Cellulose-Papier mittels Hochspannungselektrophorese bei 500 V und/oder zweidimensional durch Hochspannungselektrophorese auf Celluloseacetat-Streifen bei 5000 V und anschließende Homochromatographie auf DEAE-Cellulose-Dünnschichtplatten aufgetrennt.

Aus den Autoradiographien der elektrophoretischen bzw. chromatographischen Auftrennungen konnten dann - im einen Fall mit Hilfe der bekannten "M"-Werte (56, 71), im anderen Fall durch den Vergleich der unterschiedlichen Mobilitäten der einzelnen 5'-³²P-markierten Abbauprodukte eines Oligonukleotids - die Sequenzen aller isolierten Oligonukleotide ermittelt werden.

Da mit Hilfe der Hochspannungs-Papierelektrophorese eindeutige Aussagen über die Sequenz eines Oligonukleotids nur bis zu einer Kettenlänge von ca. 5 - 7 Nukleotiden bzw. für die ersten 5 - 7 5'-benachbarten Nukleotide eines längeren Fragments möglich sind, wurde die Sequenzanalyse aller längeren Fragmente mit Hilfe beider oben genannter Methoden durchgeführt. Obwohl die Kombination von Hochspannungselektrophorese und Homochromatographie eigentlich die umfassendere Information liefert, wurde gleichwohl auf die Sequenzanalyse mittels eindimensionaler Papierelektrophorese nicht verzichtet, da hiermit zum Teil exaktere Aussagen getroffen werden konnten, so beispielsweise bei der Unterscheidung der Dinukleotide AA und AC, GA und GC oder CA und CC am 5'-Ende von Oligonukleotiden.

Die Sequenzen aller nach vollständiger Spaltung mit RNase T₁ oder mit RNase A erhaltenen Fragmente zeigt Tab. 2 (S. 31). Die Sequenzen der Fragmente T-1 bis T-15 und A-1 bis A-11 wurden dabei nur mittels der Hochspannungs-Papierelektrophorese bestimmt, während zur Sequenzermittlung der Fragmente T-16 bis T-40 und A-12 bis A-32 Hochspannungs-Papierelektrophorese und zweidimensionale Hochspannungselektrophorese/Homochromatographie angewendet wurden.

Die Sequenzermittlung einiger Oligonukleotide war dabei zum Teil mehr oder weniger problematisch:

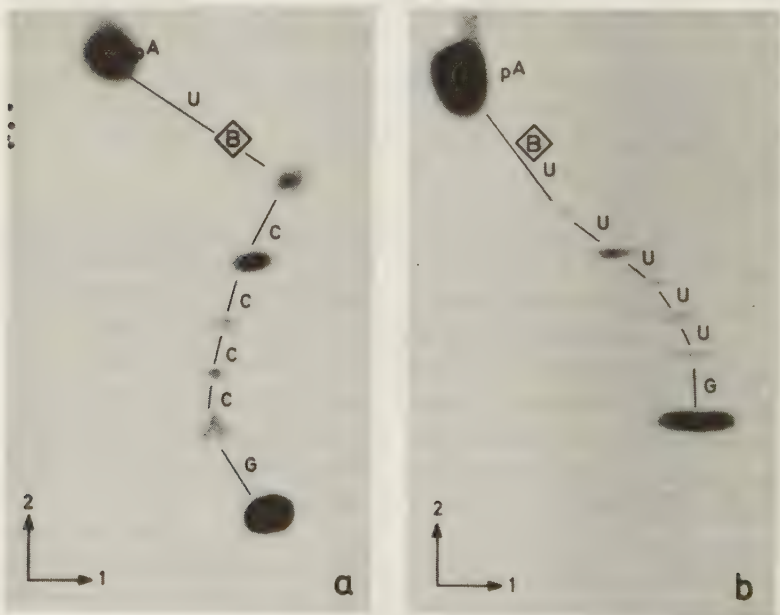


Abb. 16: Autoradiographien der partiellen P₁-Spaltmuster von Fragment T-26 vor Bisulfitbehandlung (a, AUCCCCG) und nach Bisulfitbehandlung (b, AUUUUUG). Die zweidimensionale Auftrennung entspricht der in Abb. 12, jedoch wurde eine 50 mM KOH - Homochromatographielösung verwendet.

T-26 (AUCCCCG): Da die Cytidine dieses Fragments durch Bisulfit-Behandlung von PSTV nicht zu Uridin modifiziert wurden (67), galt es zu klären, ob dies darauf beruhte, daß eines oder mehrere dieser Cytidine (etwa zu m⁵C) modifiziert waren. Dazu wurde das isolierte Oligonukleotid mit Bisulfit behandelt, wodurch Cytidine in Uridine überführt, modifizierte Cytidine jedoch nicht angegriffen werden (72 - 74). Nach der Bisulfit-Behandlung des Oligonukleotids wurde durch eine Bio-Gel P-2-Säule das überschüssige Bisulfit entfernt und das erhaltene Produkt sequenziert. Wie aus Abb. 16 b zu ersehen ist, waren alle Cytidine zu Uridin modifiziert worden, d. h. die Sequenz des unmodifizierten Fragments mußte tatsächlich AUCCCCG (Abb. 16 a) lauten.

T-36 (CUACUACCCG): Die Sequenz der ersten sechs Nukleotide dieses Fragments konnte ohne Schwierigkeiten ermittelt werden. Es erwies sich jedoch als fast unmöglich, durch die übliche kontrollierte P₁-Spaltung des Fragments auch die 5'-³²P-markierten Abbauprodukte mit einer Kettenlänge von 7 und mehr Nukleotiden zu erhalten (Abb. 17 a).

Durch eine kontrollierte Spaltung des Fragments mit Schlangengiftphosphodiesterase, einer Exonuklease, die vom 3'-Ende her 5'-Mononukleotide abspaltet, und die Isolierung besonders früher Abbauprodukte mit anschließender zweidimensionaler Auftrennung konnte schließlich die Sequenz dieses Oligonukleotids doch eindeutig ermittelt werden (Abb. 17 b).

Ähnliche Probleme traten auch bei den Oligonukleotiden T-34 (UCCUUCCUG), T-35 (UUCACACCUG) und T-38 (AACUAAACUG) auf, die jedoch auf die gleiche Weise, d. h. Verwendung von Schlangengiftphosphodiesterase anstelle von Nuklease P₁, gelöst werden konnten (Abb. 18). Voraussetzung für die Anwendung der Schlangengiftphosphodiesterase war jedoch, daß

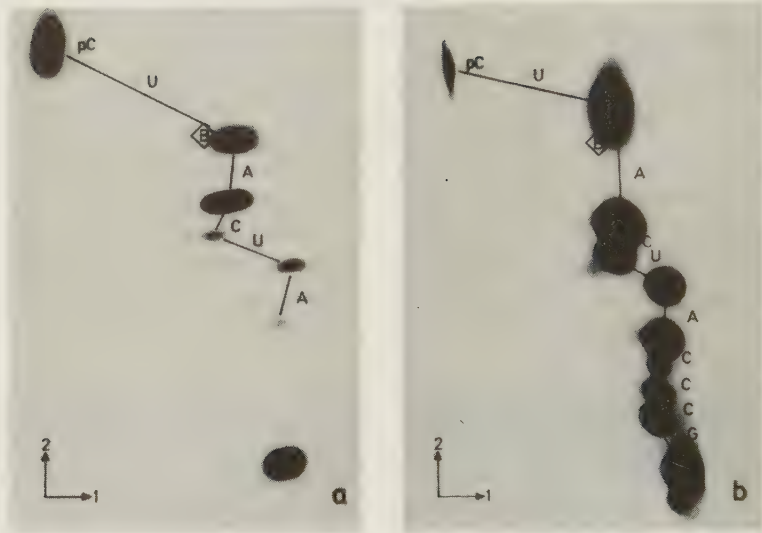


Abb. 17: Autoradiographien der partiellen P_1 (a) - und Schlangengiftphosphodiesterase (b) $_1$ - Spaltmuster von Fragment T-36. Die zweidimensionale Auftrennung entspricht der in Abb. 16. Nur mit Hilfe der Schlangengiftphosphodiesterase-Spaltung, wofür wiederum die Gradienten-Dünnschichtchromatographie zur vorherigen Auftrennung des RNase T_1 - Hydrolysats eine notwendige Voraussetzung war, konnte die vollständige Sequenz CUACUACCCG ermittelt werden.

die vorherige Auftrennung der 5'- ^{32}P -markierten Fragmente, d. h. das Erstellen der Fingerprints, nicht mittels Homochromatographie, sondern Gradienten-Dünnschichtchromatographie durchgeführt wurde, so daß die isolierten Oligonukleotide kein RNA-Hydrolysat aus der Homochromatographielösung enthielten.

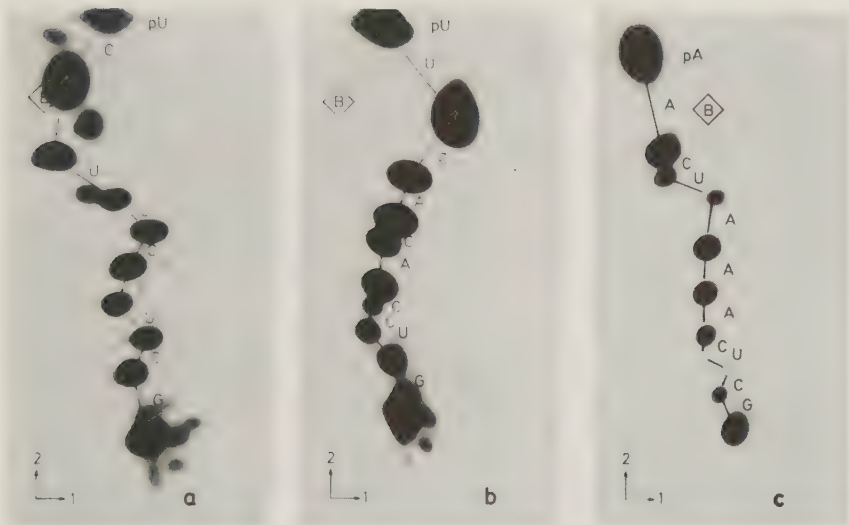


Abb. 18: Autoradiographien der Oligonukleotide T-34, T-35 und T-38 nach kontrollierter Spaltung mit Schlangengiftphosphodiesterase und anschließender zweidimensionaler Auftrennung entsprechend Abb. 16.
(a): T-34 (UCCUUCCUCG)
(b): T-35 (UUCACACCUG)
(c): T-38 (AACUAAACUCG)

Ebenfalls bereitete die Sequenzermittlung der Fragmente T-39 (CUUUUUCUCUAUCUUACUUG) und T-40 (UUUUCACCCUUCUUUUCUUG) Schwierigkeiten, da die Ausbeute dieser beiden Oligonukleotide nach Phosphorylierung und zweidimensionaler Auftrennung zum Teil nur sehr gering war. Hier traten dann jedoch vier weitere Fragmente auf, was vermuten ließ, daß die

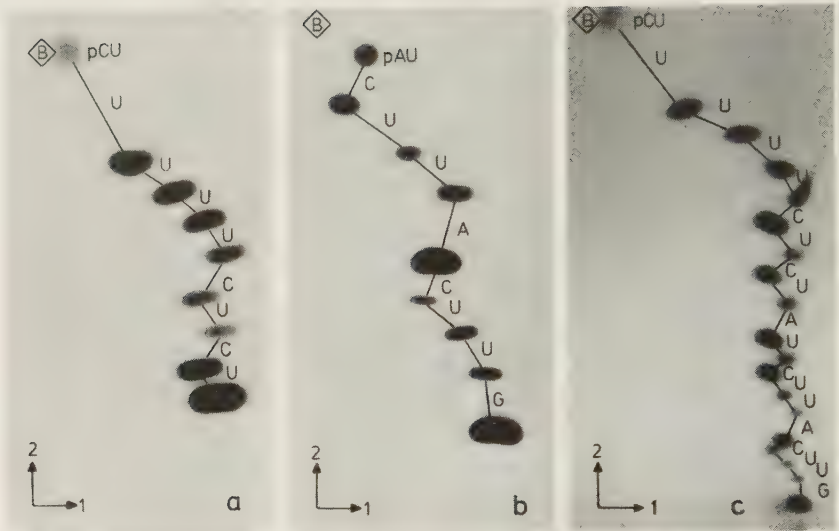


Abb. 19: Autoradiographien der Abbauprodukte T-39a (a, CUUUUCUCU) und T-39b (b, AUCUUACUUG) des Fragments T-39 (c, CUUUUCUCUAUCUUACUUG) nach kontrollierter Spaltung mit Nuklease P_1 und anschließender zweidimensionaler Auftrennung entsprechend Abb. 16.

beiden langen Fragmente T-39 und T-40 sehr leicht abgebaut wurden. Die Sequenzanalyse der vier neu auftretenden als auch schließlich der beiden langen Oligonukleotide bestätigte dies dann auch. Wie Abb. 19 zeigt, ergeben die Fragmente T-39a (CUUUUCUCU) und T-39b (AUCUUACUUG) zusammen T-39 (CUUUUCUCUAUCUUACUUG). Entsprechend kann Fragment T-40 (UUUUCACCCUCCUUUCUUCG) aus den beiden Oligonukleotiden T-40a (UUUUC) und T-40b (ACCCUCCUUUCUUCG) kombiniert werden (Abb. 20).

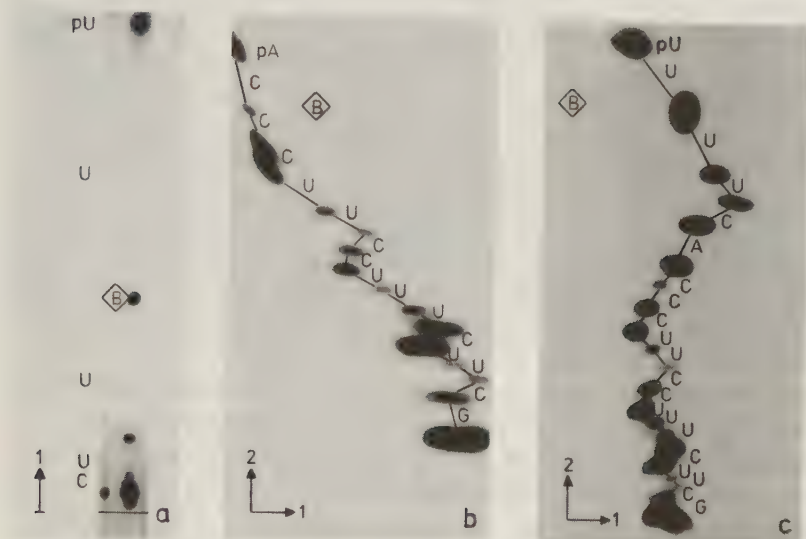


Abb. 20: Autoradiographien der Abbauprodukte T-40a (a, UUUUC) und T-40b (b, ACCCUCCUUUCUUCG) des Fragments T-40 (c, UUUUCACCCUUCUUCUUCG) nach kontrollierter Spaltung mit Nuklease P₁ und anschließender eindimensionaler Hochspannungspapiererelektrophorese bei 500 V in Pyridin-Acetat, pH 3,5 (a) bzw. zweidimensionaler Auftrennung wie in Abb. 16 (b und c).

Bei der Sequenzanalyse der Oligonukleotide, die durch vollständige Spaltung mit RNase A erhalten worden waren, ergaben sich teilweise dadurch Probleme, daß einige Fragmente unterschiedlicher Sequenz, jedoch gleicher Bruttonukleotidzusammensetzung vorlagen, deren Trennung auf üblichem Weg nicht möglich war. Die Auftrennung gelang schließlich durch eine stark verlängerte Elektrophorese in der 1. Dimension (Laufstrecke des blauen Farbstoffs Xylen-Cyanol bis zu 50 cm). Auf diese Weise wurde es möglich, auch die Oligonukleotide

A-17, A-18 und A-19 und die Oligonukleotide A-23 und A-24 zu trennen, um anschließend deren Sequenzen separat und daher eindeutig bestimmen zu können. Eine Trennung von A-25 und A-26 war auch durch diese erheblich verlängerte Elektrophorese nicht möglich; allerdings war sie in diesem Fall auch nicht notwendig, da auch aus dem Gemisch der beiden Oligonukleotide deren Sequenzen (AGGAGU und AGGGAU) eindeutig bestimmt werden konnten.

Diese Trennungen von Oligonukleotiden gleicher Bruttonukleotidzusammensetzung werden durch die je nach ihrer Position im Oligonukleotid unterschiedlichen Einflüsse der einzelnen Nukleotide auf die elektrophoretische Gesamtmobilität des Oligonukleotids möglich: So kann man beobachten, daß der mobilitätserhöhende Einfluß von Guanosin um so höher ist, je näher es am 5'-Ende des Oligonukleotids lokalisiert ist. Das bedeutet wiederum, daß eine elektrophoretische Trennung von Oligonukleotiden gleicher Bruttonukleotidzusammensetzung um so besser möglich ist, je näher die Sequenzunterschiede, d. h. im Fall von RNase A - Oligonukleotiden die Positionswechsel von Adenosinen und Guanosinen, am 5'-Ende des Oligonukleotids auftreten.

Deshalb konnten auch die Oligonukleotide GAGAAC und GGAAAC voneinander getrennt werden, da hier ein Positionswechsel eines Guanosins von Nukleotid 3 zu Nukleotid 2 (vom 5'-Ende aus gerechnet), verbunden mit dem Positionswechsel des Adenosins von Nukleotid 2 zu Nukleotid 3, vorliegt. Bei den Oligonukleotiden AGGAGU und AGGGAU war die Trennung nicht mehr möglich, da die Sequenzunterschiede erst in Position 4 und 5 lokalisiert sind.

Analoge Beobachtungen wurden auch bei der Auftrennung der Oligonukleotide A-17, A-18 und A-19 gemacht.

Ähnliche Trenneffekte werden auch von Volckaert et al. beschrieben, nämlich daß bei Oligonukleotiden gleicher Bruttozusammensetzung Uridine im 5'-Bereich die elektrophoretische Mobilität stärker erhöhen, als wenn sie im 3'-Bereich lokalisiert sind (75).

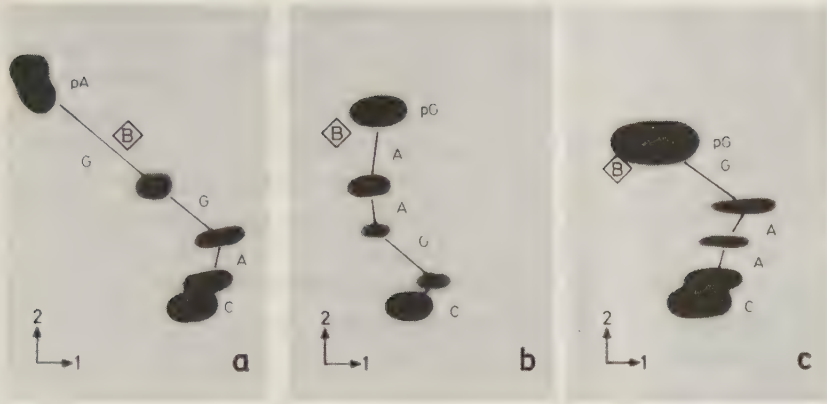


Abb. 21: Autoradiographien der rein isolierten Oligonukleotide A-17 (a. AGGAC), A-18 (b. GAAGC) und A-19 (c. GGAAC) nach kontrollierter Spaltung mit Nuklease P_1 und anschließender zweidimensionaler Auftrennung entsprechend Abb. 16.

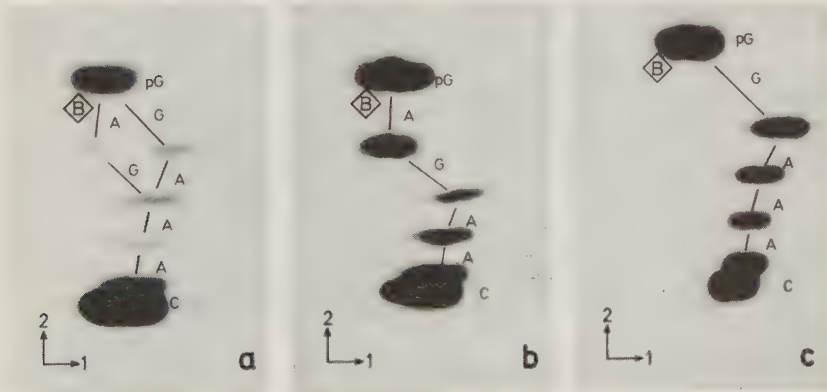


Abb. 22: Autoradiographien des Gemisches der beiden Oligonukleotide A-23 und A-24 (a) und der beiden rein isolierten Oligonukleotide A-23 (b, GAGAAC) und A-24 (c, GGAAAC) nach kontrollierter Spaltung mit Nuklease P_1 und anschließender zweidimensionaler Auftrennung entsprechend Abb. 16.

Bei den Fragmenten A-31 und A-32 war die Bestimmung der Sequenz am 3'-Ende des Oligonukleotids nur durch eine verlängerte Homochromatographie in einer 10 mM KOH - Homochromatographielösung möglich, weil dadurch eine bessere Auftrennung der langen Abbauprodukte in der 2. Dimension erreicht werden konnte (Abb. 23). Die hier auftretenden Schwierigkeiten beruhten darauf, daß bei Polypurinsequenzen mit großen Abständen zwischen den einzelnen Abbauprodukten das Ausgangsmaterial und auch die langen Abbauprodukte eine viel geringere Mobilität in der 2. Dimension besitzen verglichen mit einem gemischten, auch mehrere Pyrimidine enthaltendem Oligonukleotid.

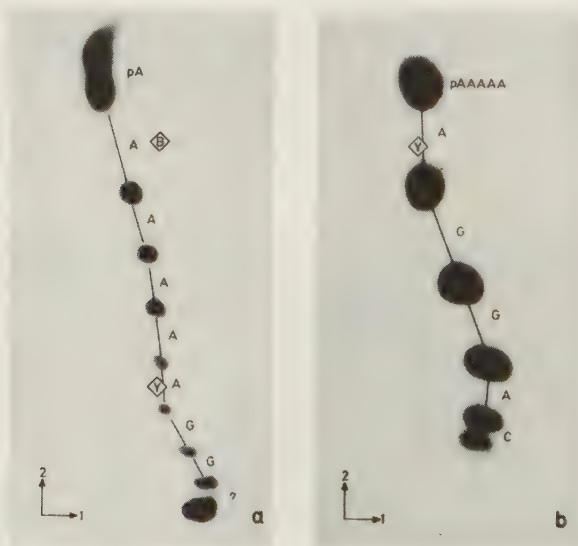


Abb. 23: Autoradiographien der zweidimensionalen Auftrennungen einer kontrollierten Schlangengiftphosphodiesterase-Spaltung von Fragment A-31 (AAAAAAGGAC).
 1. Dimension: Hochspannungselektrophorese auf Celluloseacetat-Streifen, pH 3,5;
 2. Dimension: Homochromatographie in einer 10 mM KOH - Homochromatographielösung.
 (a): Laufstrecke des Farbstoffs Xylen-Cyanol (B) = 27 cm; Laufstrecke des Farbstoffs Methylorange (Y) = 12 cm.
 (b): Laufstrecke des Farbstoffs Methylorange (Y) = 27 cm.

Schließlich sollen noch die in Abb. 12 mit X bezeichneten Flecken erwähnt werden, die als Nukleosid-3',5'-Diphosphate identifiziert werden konnten. Sie sind als Nebenprodukte durch Phosphorylierung von 3'-Nukleotiden entstanden, die während der Phosphatase-Behandlung nicht dephosphoryliert worden waren.

3.2.1.3. Stöchiometrie der einzelnen Oligonukleotide

Neben den Nukleotidsequenzen der Fragmente, die nach vollständiger Spaltung mit RNase T₁ und RNase A erhalten wurden, gibt Tab. 2 auch die molaren Verhältnisse der einzelnen Oligonukleotide an.

Die unter (a) aufgeführten, unkorrigierten Werte wurden durch Čerenkov-Zählung der aus mehreren unabhängigen Fingerprints isolierten Flecken erhalten. Nun erscheinen sowohl im RNase T₁ - als auch im RNase A - Fingerprint Flecken, die zwei oder sogar drei Fragmente zwar gleicher Bruttozusammensetzung, jedoch unterschiedlicher Sequenz enthalten. Im Falle von T-5/6, T-8/9 und A-6/7 konnte das Verhältnis der jeweiligen beiden Fragmente zueinander durch die Bestimmung des Verhältnisses der unterschiedlichen Endgruppen geklärt werden. Um die exakte Stöchiometrie der in den Flecken A-17/18/19, A-23/24 und A-25/26 enthaltenen Oligonukleotide zu ermitteln, die zum Teil die gleichen 5'-Endgruppen enthalten, mußten diese Oligonukleotide vorher durch eine erheblich verlängerte Hochspannungselektrophorese in der 1. Dimension getrennt werden (Laufstrecke von Xylen-Cyanol: 50 cm).

Für die Berechnung wurden dann jeweils die Mengen der Oligonukleotide T-19 (AAAAG) bzw. A-12 (AAAC) gleich 1 gesetzt, da kurze Oligonukleotide mit mehreren Adenosinen am 5'-Ende praktisch quantitativ phosphoryliert wurden.

In Spalte (b) der Tab. 2 sind die korrigierten molaren Verhältnisse aufgeführt. eine Korrektur der unter (a) stehenden Werte war notwendig, da in einigen Fällen die durch einfache Radioaktivitätsmessung ermittelte Stöchiometrie als viel zu gering erschien. Das hat seine Ursache in dem leichten sekundären Abbau langer Fragmente oder in der schlechteren Phosphorylierbarkeit einiger Fragmente, zum Beispiel bedingt durch eine Guanosin-reiche Sequenz am 5'-Ende oder durch Sekundärstruktureffekte des Oligonukleotids aufgrund von Selbstkomplementarität oder Assoziation mit anderen Oligonukleotiden.

Diese Korrektur wurde durch gegenseitige Kontrolle analoger Teilsequenzen in den Oligonukleotiden der RNase T₁ - und RNase A - Fingerprints durchgeführt:

So ist es beispielsweise notwendig, daß im RNase A - Fingerprint genauso viele Oligonukleotide auf GAC endigen wie im RNase T₁ - Fingerprint mit AC beginnen. Das lange RNase A - Fragment A-32 (AGAAAAGAAAAAGAAGGC) muß, obwohl es nach der Radioaktivitätsmessung nur den Wert 0,1 erhalten hat, auf jeden Fall einmal vorhanden sein, da im RNase T₁ - Fingerprint mit Sicherheit die Fragmente T-19 (AAAAG) und T-28 (AAAAAAG) je einmal vorkommen, und da auch kein anderes RNase A - Fragment diese RNase T₁ - Sequenzen enthält.

Natürlich war diese gegenseitige Kontrolle analoger Teilsequenzen nicht immer möglich, wie zum Beispiel bei dem Fragment A-21 (GGGGC). Da die vorliegende Viroidpräparation jedoch zumindest zu 99 % rein war, konnte man auch im Fall von GGGGC davon ausgehen, daß dieses Oligonukleotid auf jeden Fall einmal im Viroid-Molekül vorkommt, obwohl nach Čerenkov-Messung nur ein molares Verhältnis von 0,3 gefunden wurde.

Ein Vergleich dieser korrigierten Werte (Tab. 2, b) mit der nach Fertigstellung der Viroid-Gesamtsequenz sich

schließlich ergebenden tatsächlichen Stöchiometrie der einzelnen Oligonukleotide im Viroid-Molekül (Tab. 2, c) unterstreicht die Präzision, die durch die eben beschriebene Korrektur erreicht werden konnte.

3.2.2. Kontrollierte Spaltungen von PSTV, 5'-Phosphorylierung, Auftrennung und Sequenzierung der langen Spaltprodukte (60)

Die Sequenzanalyse der Fragmente, die durch vollständige Spaltung von PSTV mit den Ribonukleasen T_1 bzw. A erhalten worden waren, lieferte selbstverständlich nicht genügend Informationen, um bereits genauere Aussagen über die Primärstruktur des untersuchten Viroids zuzulassen. Es gab vielmehr nur eine einzige Überlappung zweier Oligonukleotide, d. h. es konnte lediglich die Verknüpfung des Fragments AGGGAU (A-26) mit dem Fragment AUCCCCG (T-26) zu der daraus resultierenden Sequenz AGGGAUCCCCG konstruiert werden.

Um die Primärstruktur von PSTV zu erstellen, mußten deshalb durch partielle, kontrollierte Spaltungen mit verschiedenen Enzymen längere, überlappende Fragmente produziert werden, deren Sequenzen anschließend mittels adäquater Methoden zu bestimmen waren.

3.2.2.1. Darstellung, 5'-Phosphorylierung, Auftrennung und Isolierung langer, überlappender Oligonukleotide von PSTV

Partielle Spaltungen von Viroid-RNA wurden mit den Ribonukleasen T_1 , A, Phy I und CM-RNase durchgeführt, wobei "partiell" bedeutet, daß das eingesetzte Substrat, die Viroid-RNA, unter limitierenden Bedingungen gespalten wurde. Diese wurden erreicht durch:

- a) Verringerung der Enzymkonzentration im Spaltansatz
- b) Verkürzung der Inkubationsdauer
- c) Erniedrigung der Inkubationstemperatur
- d) Zugabe von NaCl, um die Sekundärstruktur der RNA zu stabilisieren.

Die erwähnten Bedingungen wurden entweder separat oder miteinander kombiniert angewendet. Die Rezepte für die

verschiedenen Spaltansätze zeigt Tab. 6 im experimentellen Teil.

Die nach den Vorschriften T_1 ①, T_1 ②, T_1 ③, A ①, A ② und CM ① (Tab. 6) erhaltenen Fragmente wurden - nach 5'- 32 P-Phosphorylierung mittels γ - 32 P-ATP und T4-Polynukleotidkinase und anschließender Behandlung des Reaktionsgemischs mit Hexokinase - durch Hochspannungselektrophorese auf Celluloseacetat-Streifen bei pH 3,5 und Dünnschichtchromatographie auf DEAE-Cellulose-Platten zweidimensional aufgetrennt. Als Laufmittel für die 2. Dimension wurde dabei entweder eine 20 mM KOH - Homochromatographielösung oder ein Ammonium-Formiat-Gradient von 0,4 M - 0,6 M verwendet. Die auf der Dünnschichtplatte durch Autoradiographie sichtbar gemachten Oligonukleotide wurden auf dieselbe Art und Weise isoliert und gereinigt wie sie bei den durch Totalspaltung erhaltenen Oligonukleotiden beschrieben ist.

Da die beschriebene Trennmethode die stark heterogenen Oligonukleotidgemische nur äußerst unbefriedigend auftrennte - es konnten nur relativ wenige Fragmente bis zu einer Kettenlänge von ca. 30 Nukleotiden sauber isoliert werden - wurden daraufhin die RNA-Hydrolysate, die nach den in Tab. 6 beschriebenen Rezepten T_1 ④, T_1 ⑤, A ③, CM ②, CM ③ und Phy I erhalten wurden, durch zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (55, 63) aufgetrennt.

Zuvor waren die durch enzymatische Spaltung erhaltenen Fragmente, im Fall von Phy I nach vorherigem Phenolisieren, mit Äthanol gefällt und mit γ - 32 P-ATP und T4-Polynukleotidkinase 5'-phosphoryliert worden, wobei allerdings auf die Hexokinasebehandlung verzichtet werden konnte, da bei dieser Trennmethode überschüssiges γ - 32 P-ATP sich nicht störend auswirkt. Die Abbildungen 24 und 25 zeigen die mit vier unterschiedlichen Enzymen unter verschiedenen limitie-

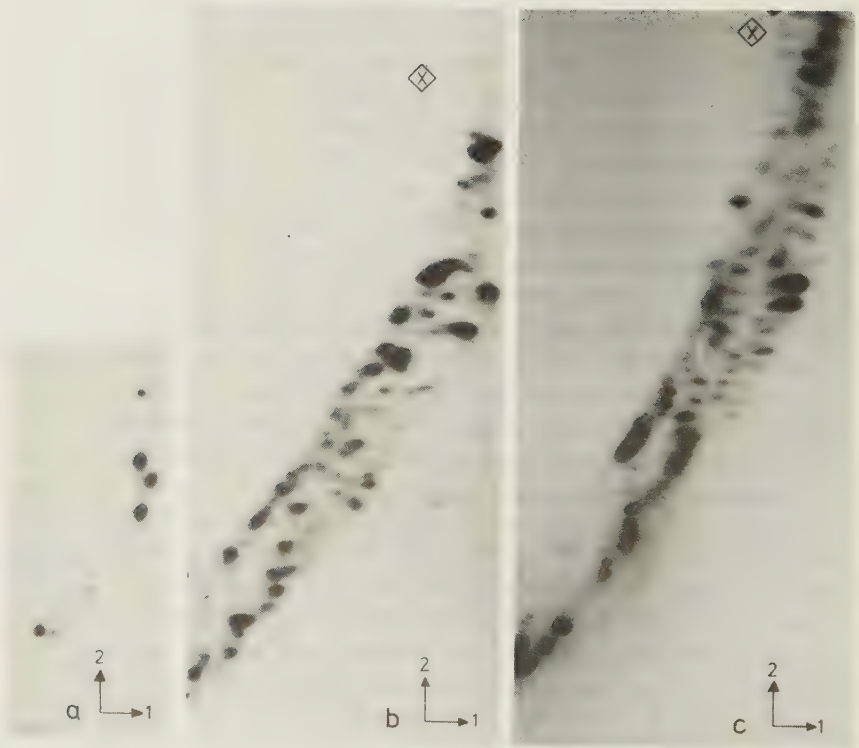


Abb. 24: Autoradiographien von PSTV nach kontrollierter Spaltung mit RNase T₁ (a, b) bzw. RNase Phy I (c) (Rezepte T₁ ⑤ bzw. Phy I, s. Tab. 6), 5'-Endgruppenmarkierung und zweidimensionaler Polyacrylamidgelelektrophorese.
1. Dimension: 10 % Polyacrylamid, 7 M Harnstoff, 25 mM Na-Citrat, pH 3,5;
2. Dimension: 15 % (a) bzw. 20 % (b, c) Polyacrylamid, 7 M Harnstoff, 90 mM Tris-Borat, 4 mM Na₂EDTA, pH 8,3.
X ≙ Position des blauen Farbstoffs Xylen-Cyanol.

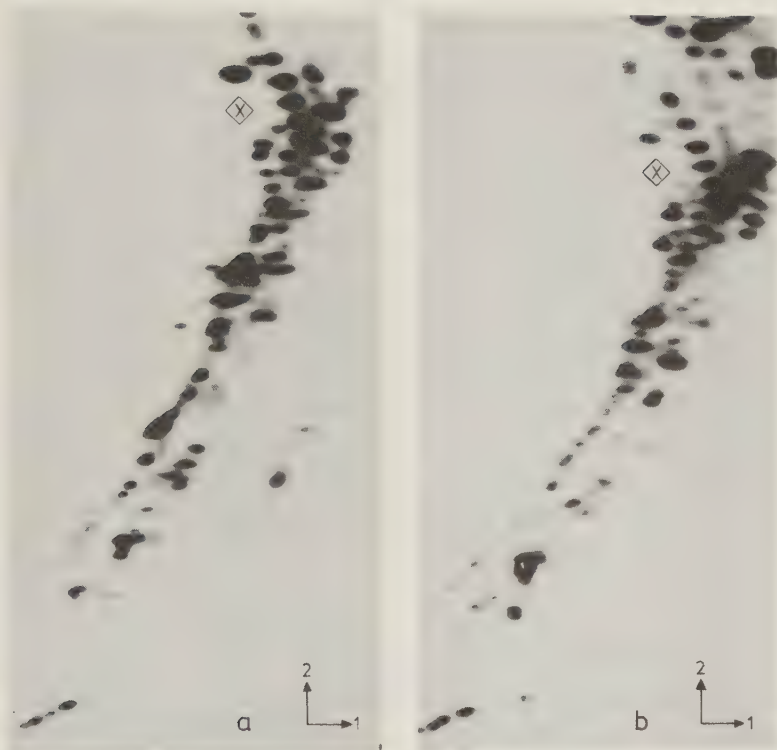


Abb. 25: Autoradiographien von PSTV nach kontrollierter Spaltung mit RNase A (a) bzw. CM-RNase (b) (Rezepte A ③ bzw. CM ②, s. Tab. 6), 5'-Endgruppenmarkierung und zweidimensionaler Polyacrylamidgelelektrophorese wie in Abb. 24.
X = Position des blauen Farbstoffs Xylen-Cyanol.

renden Bedingungen erhaltenen Spaltmuster von PSTV nach Auftrennung der Spaltprodukte durch zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese.

Nach Autoradiographie wurden die 5'-³²P-markierten Fragmente durch Ausschneiden der Gelstückchen, elektrophoretische Elution (64) und Äthanol-Fällung (bzw. Dialyse, wenn die elektrophoretische Elution RNA-frei durchgeführt wurde) isoliert.

Gegenüber der bisher üblichen Extraktion der Oligonukleotide durch Homogenisation, Diffusion und Filtrieren hat die elektrophoretische Elution einige entscheidende Vorteile: Es können bei geringerem Arbeitsaufwand bis zu 50 Proben pro Person gleichzeitig und außerdem in kürzerer Zeit extrahiert werden. Die Prozedur erscheint schonender, da kein stundenlanges Schütteln bei hohen Temperaturen und leicht alkalischem pH notwendig ist. Schließlich liefert dieses Verfahren Ausbeuten bis zu 100 %, und die erhaltenen Proben sind sauberer, d. h. absolut frei von Polyacrylamid.

3.2.2.2. Sequenzanalyse langer Oligonukleotide

Die Nukleotidsequenzen der Fragmente, die nach den kontrollierten Spaltungen aus den Homo- oder Gradienten-Dünnschichtchromatogrammen isoliert worden waren, wurden in gleicher Weise, wie es bereits für die Oligonukleotide aus den vollständigen RNase T₁ - und RNase A - Spaltungen beschrieben wurde, durch die Analyse der Mobilitätsänderung der Abbauprodukte ("mobility shift" - oder "wandering spot" - Methode) ermittelt, d. h. durch kontrollierte Spaltung des Oligonukleotids mit Nuklease P₁ bzw. Schlangengiftphosphodiesterase und anschließende zweidimensionale Auftrennung der Abbauprodukte über Hochspannungselektrophorese/Homochromatographie. Neben einigen bereits bekannten Oligonukleotiden wurde eine ganze Reihe neuer, überlappender Oligonukleotide erhalten

und, soweit möglich, sequenziert.

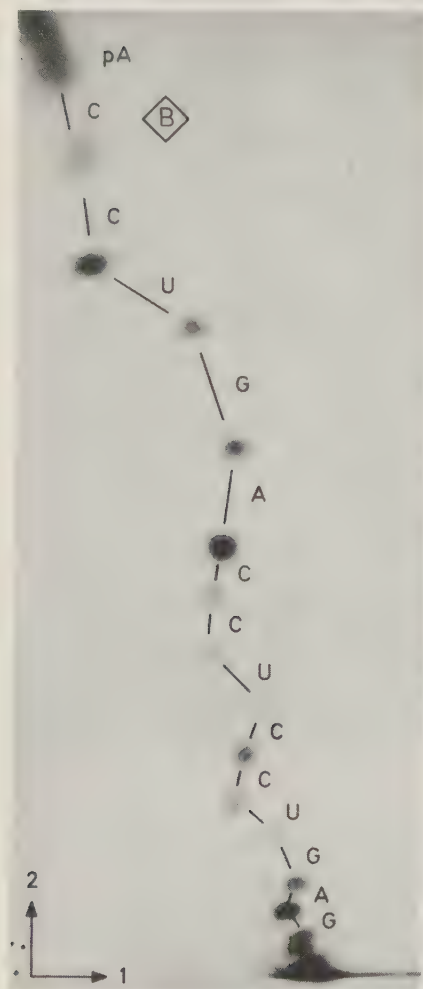
Eine Aufstellung dieser sequenzierten Fragmente bringt Tab. 3.

Nr.	a	b	c
1 2	CGCUUCAGGGAUCCCG ACCACCCUCGCC...	(79 - 95) (222 - 235)	T ₁ ①
3 4 5 6 7	CGCUUCAGGGA... CUUCAGGGA... AUCCCCGGGA... ACCACCCUCGCC... CUUCGG...	(79 - 89) (81 - 89) (89 - 99) (222 - 237) (315 - 320)	T ₁ ②
8 9	AAACAGGGUUUCA... ACCACCCUCGCC...	(169 - 182) (222 - 236)	T ₁ ③
10 11 12 13 14 15 16 17	GGCUCGAGGAGC GGCUCGAGGAGCGC AGGGUU AGGGUUU AGGGUUUU ACCCUCGCC... ACCCUCGCC... CGGGGCGAGGGU	(67 - 79) (67 - 81) (173 - 178) (173 - 179) (173 - 180) (225 - 235) (225 - 236) (318 - 329)	A ①
18 19 20	AGGGUUUUC CUUCGG... GAAGCUC...	(173 - 181) (193 - 198) (278 - 284)	A ②
21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32	AGCGGCCGAC AAUCCCCG AAUCCCCCGGAAAC CGAAAC AGGGUUUUCAC... AGGGUUUUCACCUUC AGGACC ACCCGGUGGAAAC GGUGGAAAC AACUGAAGCUCCG... GAGAACC ACUUGCUUCGGGGCGA...	(142 - 151) (158 - 166) (158 - 172) (167 - 172) (173 - 183) (173 - 188) (219 - 224) (261 - 273) (265 - 273) (274 - 287) (287 - 293) (310 - 325)	CM ①

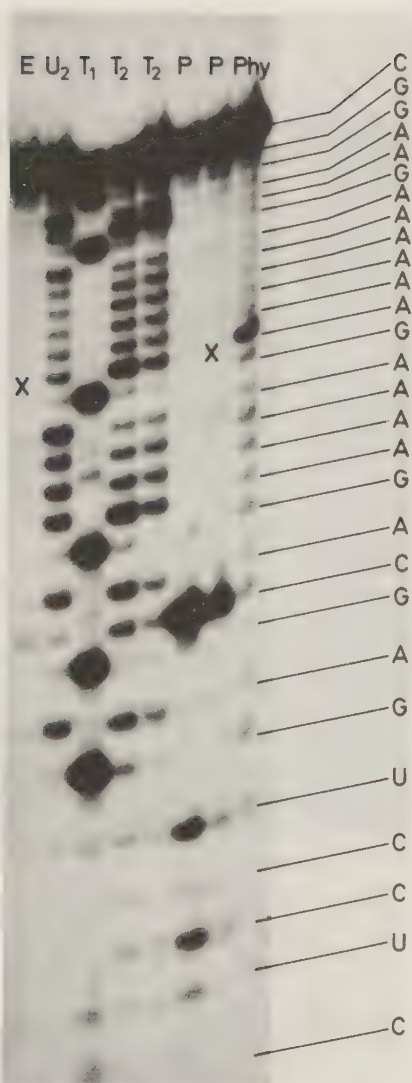
Tab. 3: Überlappende Nukleotidsequenzen (a), die aus verschiedenen Spaltansätzen (c, s. Tab. 6) von PSTV nach Auftrennung der 5'-³²P-markierten Fragmente mittels zweidimensionaler Hochspannungselektrophorese/Homo- oder Gradienten-Dünnschichtchromatographie und anschließender Sequenzanalyse erhalten wurden. (b) gibt die Position des Fragments in der endgültigen PSTV-Primärstruktur (s. Abb. 35) an.
Die Punkte hinter einigen Sequenzen sollen andeuten, daß das entsprechende Oligonukleotid noch länger war, die weitere Nukleotidfolge jedoch nicht eindeutig bestimmt wurde.

Die Fragmente, die aus den Polyacrylamidgelen isoliert worden waren, wurden mit Hilfe zweier verschiedener Methoden analysiert. Für die Sequenzermittlung der ersten 15 - 20 Nukleotide (vom 5'-Ende her) diente die Analyse der unterschiedlichen Mobilitäten der durch Behandlung mit Nuklease P_1 erzeugten 5'-markierten Abbauprodukte. Die weitere Nukleotidfolge des Fragments (etwa ab Nukleotid 10) wurde mittels der erst kürzlich entwickelten Methoden zur schnellen Sequenzierung durch Polyacrylamidgelelektrophorese (46, 47) bestimmt. Die Abbildungen 26 - 29 bringen dafür einige Beispiele.

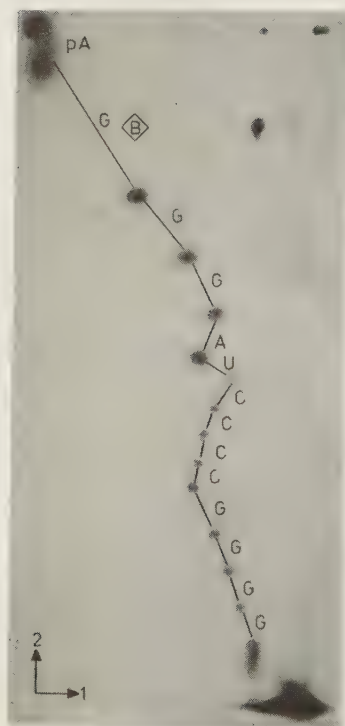
Abb. 26: Sequenzanalyse von Partialfragment Nr. 60 (Nukleotide 32-66, s. Abb. 35).
(a): Zweidimensionale Auftrennung eines partiellen P_1 -Hydrolysats dieses Fragments durch Hochspannungselektrophorese auf Celluloseacetat-Streifen, pH 3,5 (1. Dimension) und Homochromatographie an DEAE-Cellulose in einer 15 mM KOH - Homochromatographielösung (2. Dimension).
(b): Auftrennung verschiedener kontrollierter enzymatischer Spaltungen dieses Fragments durch Polyacrylamidgelelektrophorese auf einem Sequenzgel (pH 8,3) bei 1000 V.
-E: Kontrolle, Inkubation ohne Enzym;
 U_2 : Spaltung mit Ribonuklease U_2 ;
 T_1 : Spaltung mit Ribonuklease T_1 ;
 T_2 : Spaltung mit zwei Konzentrationen von Ribonuklease T_2 ;
P: Spaltung mit zwei Konzentrationen von Ribonuklease A;
Phy: Spaltung mit Ribonuklease Phy I.
B, X = Position des blauen Farbstoffs Xylen-Cyanol.
Die für dieses Fragment ermittelte Sequenz lautet:
ACCUGACCUCUGAGCAGAAAAGAAAAAGAAGGC,
wobei in 5'-3'-Richtung auf dem linken Bild (a) von oben nach unten und auf dem rechten Bild (b) von unten nach oben mit einer Überlappung von 8 Nukleotiden (unterstrichener Teil der Sequenz) gelesen wird.



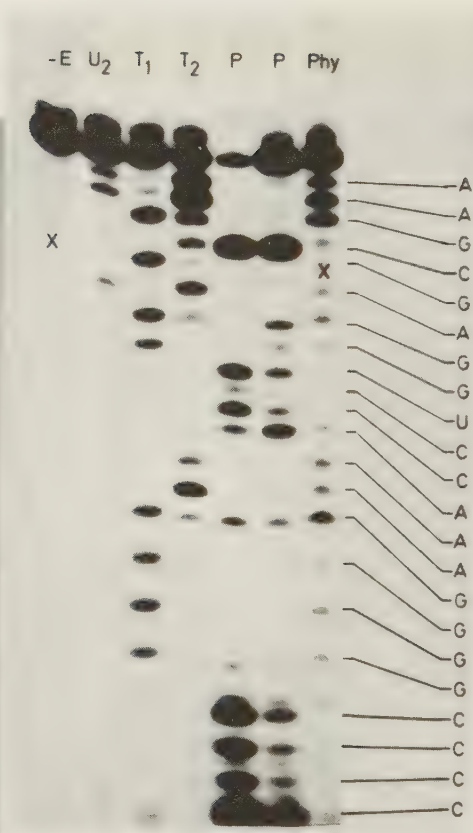
a



b



a



b

Abb. 27: Sequenzanalyse der Fragmente Nr. 69 (a und b, Nukleotide 85 - 113, s. Abb. 35) und Nr. 71 (c, Nukleotide 85 - 137, s. Abb. 35), wobei bei Nr. 71 die Aufklärung des 5'-terminalen Bereiches durch zweidimensionale Hochspannungselektrophorese/Homochromatographie nicht gezeigt wird, da dieser Bereich identisch mit dem von Nr. 69 ist.



C

Alle Bedingungen entsprechen denen in Abb. 26. Bei der Sequenzierung von Fragment Nr. 71 wurde die Hälfte der Spaltansätze einer längeren Elektrophorese unterworfen (c, rechts), um auch eine gute Auflösung im 3'-proximalen Bereich des Fragments zu erreichen.

Die Sequenz von Fragment Nr. 71 lautet:

AGGGAUCCCCGGGGAACUGGAGCGAACUGGCAAAAAAGGACGGU-
GGGGAGU....

Die folgenden Nukleotide können nicht mehr eindeutig gelesen werden.

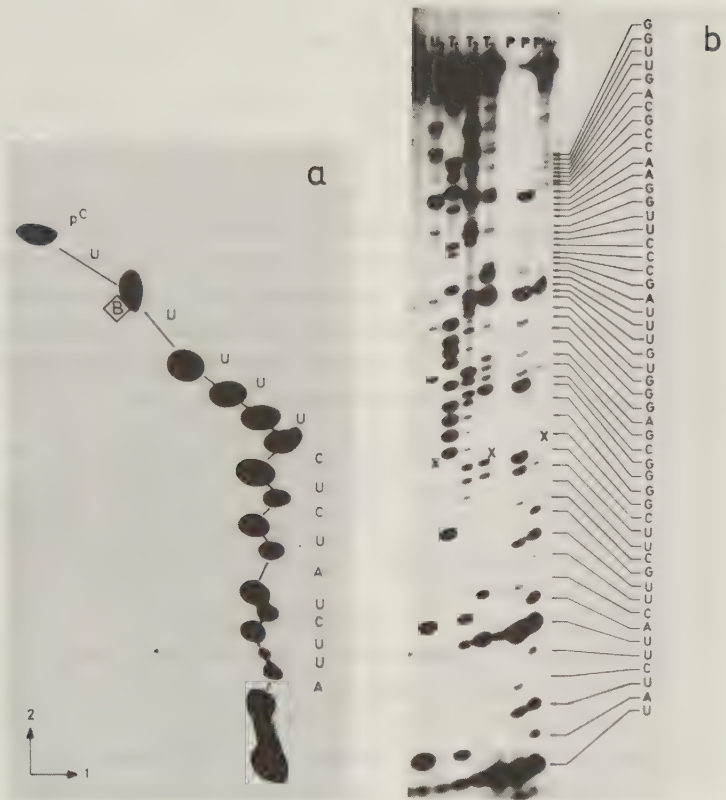


Abb. 29: Sequenzanalyse von Fragment Nr. 51 (Nukleotide 295 - 353, s. Abb. 35). Alle Bedingungen entsprechen denen in Abb. 26.
 (a): Zweidimensionale Auftrennung eines partiellen P_1 -Hydrolysats durch Hochspannungselektrophorese/Homochromatographie;
 (b): Auftrennung verschiedener kontrollierter enzymatischer Spaltungen durch Polyacrylamidgellelektrophorese, pH 8,3.
 Folgende Nukleotidfolge kann daraus abgelesen werden:
 CUUUUUCUCUAUCUUACUUGCUUCGGGGCGAGGGUGUUUAG-
 CCCUUGGAACCGCAGUUGG....

Die Sequenzen von ca. 100 Fragmenten wurden auf diese Weise erstellt, wobei jedoch anzumerken ist, daß bei manchen kürzeren Oligonukleotiden schon allein die zweidimensionale Auftrennung (Hochspannungselektrophorese/Homochromatographie) der mittels Nuklease P_1 - Spaltung erhaltenen Abbauprodukte die Aufklärung der Sequenz ermöglichte.

Es reichten allerdings nicht in jedem Fall allein die Sequenzierungsmethoden der Polyacrylamidgelelektrophorese und/oder der Mobilitätsänderung der Abbauprodukte aus, um die Sequenz des untersuchten Partialfragments eindeutig zu bestimmen. Das lag an folgenden Anomalitäten, die bei der Sequenzanalyse auf Polyacrylamidgelen auftraten:

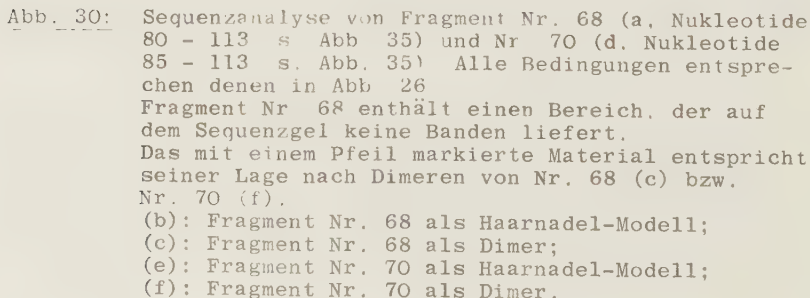
- a) Von Teilbereichen einiger Partialfragmente wurden keine Bandenmuster, sondern bandenfreie Regionen erhalten. Wie sich später herausstellte, handelte es sich dabei um zwei ganz bestimmte Bereiche in der Viroidsequenz.
- b) Die Lesbarkeit der Banden war in einigen Fällen durch deren ungewöhnliche Abstände voneinander (d. h. Streckung oder Stauchung der Abstände) erschwert.
- c) Die Unterscheidung von Cytidin und Uridin war, trotz Verwendung der Ribonuklease Phy I, einige Male nicht eindeutig möglich.

Ein Beispiel für ein Sequenzgel mit einer Region fehlender Banden wird im linken Teil der Abb. 30 gezeigt. Bei diesem Partialfragment Nr. 68 kann lediglich die Nukleotidfolge GCUUCAGGGAUCCCCGGGAAAA. CGAA. bestimmt werden. Im punktierten Bereich erscheinen nur äußerst schwache, nicht interpretierbare Banden. Der nicht lesbare Teil dieser Sequenz konnte jedoch mit Hilfe der aus Fragment Nr. 70 erhaltenen Information (Abb. 30. d) ergänzt und vervollständigt werden.

Ein Vergleich der Nukleotidsequenzen dieser beiden Fragmente ermöglicht auch eine Erklärung des Auftretens der bandenfreien Region: Wie in Abb. 30 b, c, e, f gezeigt, können beide Partialfragmente Dimere bzw. Haarnadelstrukturen ausbilden; die Pfeile in Abb. 30 a und d zeigen die Position möglicher Dimere an. In den dadurch entstehenden basengepaarten Bereichen ist der Angriff einer Nuklease stark behindert. Der Vergleich der jeweiligen Haarnadel- und Dimerstrukturen offenbart, daß das Haarnadel-Modell von Fragment Nr. 68 11 Basenpaare aufweist (Abb. 30 b), verglichen mit 6 Basenpaaren bei Fragment Nr. 70 (Abb. 30 e), und daß das Dimer von Nr. 68 sogar 10 Basenpaare mehr enthält (Abb. 30 c) als das von Nr. 70 (Abb. 30 f), nämlich 26 im Vergleich zu 16 Basenpaaren. Wahrscheinlich ist jedoch die Tatsache entscheidend, daß bei Fragment Nr. 70 - auch wenn es in Haarnadel- oder Dimerform vorliegt - der entsprechende Bereich, der in Fragment Nr. 68 keine Banden zeigt, in jedem Fall als Einzelstrang vorliegt und deswegen gut gespalten werden kann.

Als wesentlich komplizierter, verglichen mit dem eben diskutierten Fragment Nr. 68, erwies sich die Bestimmung der Sequenz von Fragment Nr. 101 (Abb. 31). Dessen Struktur konnte nur mit Hilfe mehrerer, dieses Fragment (und untereinander) überlappender Partialfragmente ermittelt werden. Die notwendige Kontrolle für die Richtigkeit der schließlich erhaltenen Sequenz erbrachte allerdings erst eine Fingerprintanalyse dieses Fragments mit Hilfe der bereits beschriebenen und im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode der "sekundären" Phosphorylierung:

Dazu wurde ein Aliquot dieses Fragments vorher RNA-frei elektrophoretisch eluiert, mit RNase T₁ bzw. RNase A gespalten, die resultierenden Oligonukleotide nach 3'-Dephosphorylierung 5'-³²P-markiert und zweidimensional über Hochspannungselektrophorese/Homochromatographie aufgetrennt. Die erhaltenen Fingerprints,



welche die zur absolut sicheren Sequenzbestimmung dieses Fragments notwendige Information lieferten, nämlich welche RNase T₁ - und RNase A - Oligonukleotide es enthält und auch deren molare Verhältnisse, zeigt die Abb. 32.

Die Sequenzanalyse dieses Fragments ist insofern interessant, als es sich hier um einen Fall handelt, wo anscheinend in erster Linie die Dimerisierung des Fragments als Ursache für fehlende Banden im Sequenzgel gelten muß. Würde nämlich das Fragment in Form einer Haarnadelstruktur vorliegen (Abb. 31 b), so sollte für den 5'-nahen, basengepaarten Bereich zumindest ein schwaches Bandenmuster auf dem Sequenzgel sichtbar sein: Nach einer Spaltung in der 3'-proximalen basengepaarten Region sollte daraufhin eine Spaltung im 5'-proximalen Bereich, der durch obige Reaktion offenkettig würde, leichter möglich werden. Prinzipiell bestünde die Möglichkeit dieser Reaktionsfolge auch in umgekehrter Richtung; sie würde jedoch wegen der radioaktiven 5'-Markierung des Fragments nicht sichtbar in Erscheinung treten.

Liegt das Fragment jedoch als Dimer vor (Abb. 31 c und Pfeil in Abb. 31 a), so muß sich sowohl im 5'-nahen, proximalen, als auch im 3'-nahen, distalen basengepaarten Bereich eine bandenfreie Region ergeben, wie es ja auch die Autoradiographie des Sequenzgels deutlich zeigt. Hier sind offensichtlich alle basengepaarten Regionen in gleicher Weise RNase-resistent.

Ein Beispiel für ungewöhnliche Abstände zwischen einzelnen Banden auf dem Sequenzgel - in diesem Fall handelt es sich um eine Stauchung - lieferte Fragment Nr. 55 (Abb. 33). Die zum Teil kürzeren bzw. gar nicht mehr vorhandenen Abstände der die verschiedenen Abbauprodukte des Fragments repräsentierenden Banden können durch unterschiedliche Sekundärstrukturen der einzelnen Abbauprodukte

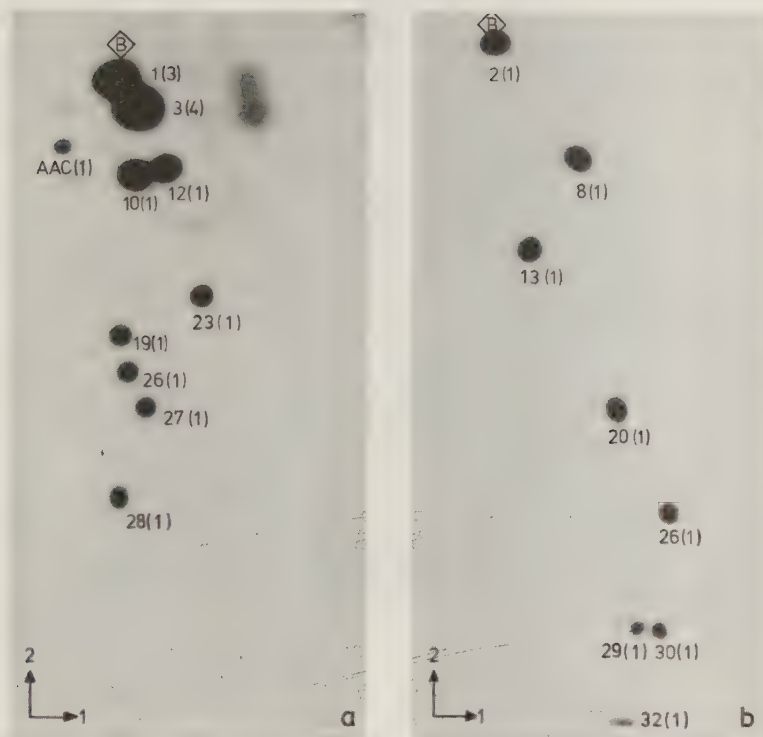


Abb. 32: Fingerprintanalyse von Fragment Nr. 101 (Nukleotide 48-113, s. Abb. 35) mit Hilfe der "sekundären" Phosphorylierung.
 (a): RNase T₁ - Fingerprint;
 (b): RNase A₁ - Fingerprint.
 Die Numerierung der Oligonukleotide entspricht der in Abb. 12 bzw. Tab. 2. Die in Klammern angefügte Zahl gibt das molare Verhältnis der einzelnen Oligonukleotide an. Die zweidimensionale Auftrennung erfolgte analog der in Abb. 8 beschrieben.
 B = Lage des Xylen-Cyanol-Farbstoffs.

erklärt werden (Abb. 33, I - IV):

Wenn man vom Abbauprodukt I (pUUGGUUCCUGGAACUA) ausgeht, das in Form einer Haarnadelstruktur vorliegen kann, dann liefert der Verlust des terminalen Adenosins das Abbauprodukt II. Aufgrund dieser Abspaltung entsteht eine nur kleine Differenz der entsprechenden Banden auf dem Sequenzgel. Das kann dadurch erklärt werden, daß die Haarnadelstruktur durch den Verlust eines Basenpaares schon merklich destabilisiert wird, sich dadurch schon zum Teil öffnet und folglich teilweise mit der offenkettigen Form, die trotz des Verlusts eines Nukleotids als voluminöser angesehen werden kann, in einem dynamischen Gleichgewicht vorliegt. Die weitere Abnahme um ein Uridin - es entsteht Abbauprodukt III - verringert zwar die Gesamtlänge des Moleküls, jedoch erfolgt auch hier eine weitere, wenn auch geringe Destabilisierung der Haarnadelstruktur durch Verlust eines GU-Paars. Die Abspaltung des folgenden Cytidins, woraus Abbauprodukt IV resultiert, destabilisiert die Haarnadelstruktur vollständig: das Oligonukleotid ist zwar kürzer geworden, jedoch hat sich sein Wirkungsquerschnitt in der Polyacrylamidgelelektrophorese nicht verringert, da es als "Knäuel" ohne basengepaarte Bereiche vorliegt. Die auf -GAAC und -GAA endigenden Abbauprodukte III und IV zeigen gleiche gelelektrophoretische Mobilität.

Bei der eben durchgeführten Betrachtungsweise wurde allerdings noch nicht der Einfluß der unterschiedlichen Ladungen der einzelnen Abbauprodukte genauer berücksichtigt. Im Normalfall wird bei Verlust eines Nukleotids die Abnahme der Ladung - das Molekül sollte langsamer laufen - durch die Abnahme der Größe - das Molekül sollte schneller laufen - überkompensiert, d. h. das Oligonukleotid läuft also im Endeffekt schneller. Im oben diskutierten Fall des Vergleichs der Abbauprodukte III und IV kann man also annehmen, daß sich Ladungsabnahme und Verringerung der Molekülgröße gerade gegenseitig aufheben.

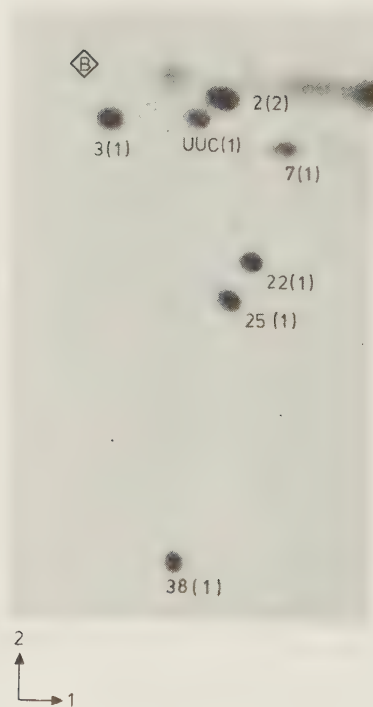


Abb. 34: Fingerprintanalyse von Fragment Nr. 117 (Nukleotide 349-29, s. Abb. 35) mittels der "sekundären" Phosphorylierung nach Spaltung mit RNase T₁. Die Nummerierung der Oligonukleotide entspricht der in Abb. 12 bzw. Tab. 2. Die in Klammern angefügte Zahl gibt das molare Verhältnis der einzelnen Oligonukleotide an. Die zweidimensionale Auftrennung erfolgte analog der in Abb. 8 beschriebenen. B = Lage des Xylen-Cyanol-Farbstoffs.

In gleicher Weise war die Ermittlung der exakten Sequenz der Fragmente Nr. 73, 117, 126, 127, 128 und 129 durch dieses ungewöhnliche Bandenmuster in diesem Bereich erschwert. Ein erster Hinweis auf die Sequenz ergab sich aus der Tatsache, daß im Spaltmuster von PSTV nach vollständiger Spaltung mit RNase T₁ nur ein Oligonukleotid existiert, das in diesen Bereich - zunächst allerdings unter Schwierigkeiten - intergriert werden konnte: Es gab nur ein RNase T₁ - Fragment, das mit AA beginnt, in der Mitte drei Adenosine enthält, worauf dann drei Pyrimidine und das 3'-terminale Guanosin folgen: das Undekanukleotid T-38 (AACUAAACUCG, s. Abb. 18 c und Tab. 2). Obwohl aufgrund des auf dem Sequenzgel sichtbaren Bandenmusters in diesem Bereich eigentlich ein RNase T₁ - Dekanukleotid lokalisiert sein sollte, konnte nur dieses Undekanukleotid (T-38) hier eingefügt werden, wobei jedoch die Voraussetzung war, daß eine der Banden wegen der elektrophoretischen Koinzidenz zweier Abbauprodukte fehlen mußte. Außerdem wäre das betreffende Oligonukleotid T-38 auch an keiner anderen Stelle unterzubringen gewesen. Eine Kontrolle für die Richtigkeit der obigen Überlegungen und der Sequenz konnte darüberhinaus mit Hilfe der "sekundären" Phosphorylierung erbracht werden (Abb. 34).

Ein weiteres Beispiel für unregelmäßige Bandenabstände lieferte in den Partialfragmenten Nr. 34, 40 und 42 der Sequenzbereich zwischen den Nukleotiden 146 - 149. Von den Sequenzanalysen auf Polyacrylamidgelen allein konnte man nicht entscheiden, ob es sich dabei um die Sequenz GCCG oder GCG handelt, da die beiden Banden, die den jeweiligen auf Cytidin endigenden Abbauprodukten entsprechen, so dicht aneinandergrenzten, daß sie praktisch zusammenfielen (Abb. 28).

Auch die Kenntnis der molaren Verhältnisse der aus den Totalspaltungen erhaltenen Oligonukleotide genügte nicht, um mit absoluter Sicherheit eine Entscheidung zwischen

beiden Möglichkeiten zu treffen.

Das Problem wurde durch das - relativ kurze - überlappende Fragment Nr. 21 (AGCGGCCGAC, s. Tab. 3) gelöst, das im PSTV-Molekül nur hier unterzubringen war und also für den fraglichen Bereich die Sequenz GCCG eindeutig festlegte. Eine Kontrolle erbrachte wiederum die Fingerprintanalyse eines langen Fragments aus diesem Bereich, die mit Hilfe der "sekundären" Phosphorylierung durchgeführt wurde. Auch damit konnte gezeigt werden, daß in diesem Strukturbereich von PSTV nur die Sequenz GCCG und nicht die Sequenz GCG vorkommt.

Schließlich soll auch noch die - trotz der Anwendung von RNase Phy I - mit Schwierigkeiten behaftete Unterscheidung von Cytidin und Uridin auf den Sequenzgelen diskutiert werden. Ganz allgemein spaltet RNase Phy I UpN-Bindungen besser als CpN-Bindungen (32, 47, 48). So war zum Beispiel die UpG-Phosphodiesterbindung viel leichter angreifbar als die von CpG. Jedoch ist die Spezifität von RNase Phy I anscheinend auch vom 3'-ständigen Nachbarnukleotid abhängig: NpU-Bindungen waren im allgemeinen ziemlich resistent und es war deshalb schwierig, zwischen UpU und CpU (in beiden Fällen keine Spaltung, also keine Bande) zu unterscheiden. In den meisten Fällen gelang es jedoch mit Hilfe der bekannten Sequenzen der Oligonukleotide aus Tab. 2 die vom Sequenzgel her noch unsicheren Nukleotidfolgen zu klären.

Als äußerst problematisch erwies sich allerdings die richtige Integration der beiden Oligonukleotide T-15 (CCCAG) und T-16 (UUUAG), die im PSTV-Molekül jeweils einmal vorkommen, in die Sequenzbereiche Nukleotid 139 - 143 bzw. 331 - 335 (s. Abb. 35). Mit Hilfe der Gelsequenzierung war eine Zuordnung nicht möglich, da mit RNase Phy I eine gleich schlechte Spaltung sowohl bei UpUpU als auch bei CpCpC erfolgte.

Ob also in den Fragmenten Nr. 35, 51, 52, 53, 54, 91, 114, 123, 134 und 135 bzw. in den Fragmenten Nr. 34, 40, 42 und 103 jeweils die eine (CCCAG) oder andere (UUUAG) Sequenz enthalten war, konnte am Ende nur durch Fingerprintanalysen der entsprechenden Fragmente mit Hilfe der "sekundären" Phosphorylierung geklärt und entschieden werden.

Tab. 4 bringt eine Auflistung aller aus den Polyacrylamidgelen isolierten und anschließend sequenzier-ten Fragmente, wobei sich die Numerierung an die von Tab. 3 anschließt. Es wurde allerdings nicht jeweils die gesamte Sequenz des analysierten Fragments aufgeführt, sondern nur die Positionen des ersten und letzten lesbaren Nukleotids in der schließlich ermittelten PSTV-Gesamtsequenz (Abb. 35).

Nr.	a	b	Nr.	a	b
33	79 - 117...	T ₁ ④	85	274 - 299	A ③
34	79 - 197...		86	274 - 300	
35	295 - 347...		87	278 - 299	
36	27 - 45...	T ₁ ⑤	88	278 - 300	
37	55 - 65...		89	278 - 304	
38	79 - 110		90	310 - 331	
39	79 - 115		91	310 - 333	
40	79 - 197...		92	334 - 344...	
41	117 - 130...		93	349 - 29	
42	117 - 201...		94	30 - 117	CM ②
43	169 - 185...		95	48 - 81...	
44	169 - 221...		96	48 - 81...	
45	202 - 218...		97	48 - 81...	
46	212 - 223...		98	48 - 88...	
47	214 - 241		99	48 - 98...	
48	242 - 287		100	48 - 98...	
49	244 - 287		101	48 - 113	
50	282 - 322...		102	48 - 113...	
51	295 - 354...		103	48 - 113...	
52	295 - 354...		104	85 - 113	
53	315 - 347		105	211 - 237	
54	315 - 350		106	258 - 273	
55	351 - 36		107	261 - 300	
56	30 - 66	A ③	108	274 - 297	
57	30 - 74...		109	274 - 302	
58	30 - 77...		110	274 - 304	
59	30 - 79		111	278 - 302	
60	32 - 66		112	278 - 304	
61	36 - 66		113	310 - 332	
62	48 - 66		114	310 - 333	
63	48 - 74...		115	349 - 6	
64	48 - 77...		116	349 - 7	
65	48 - 79		117	349 - 29	
66	48 - 81		118	158 - 241...	CM ③
67	67 - 102		119	182 - 270...	
68	80 - 113		120	182 - 273	
69	85 - 113		121	182 - 293	
70	85 - 114		122	274 - 304	
71	85 - 137...		123	310 - 348	
72	95 - 107...		124	349 - 12	
73	114 - 128...		125	349 - 13	
74	118 - 139		126	349 - 29	
75	211 - 222...		127	349 - 47	
76	219 - 242		128	349 - 64...	
77	219 - 245		129	349 - 77...	
78	219 - 273		130	158 - 238	Phy I
79	225 - 244...		131	159 - 238	
80	225 - 245		132	241 - 266	
81	225 - 248		133	242 - 266	
82	225 - 257		134	314 - 349	
83	274 - 297		135	315 - 349	
84	274 - 298				

Tab. 4: Fragmente von PSTV (a), die nach kontrollierter Spaltung von PSTV mittels verschiedener RNasen (b, Rezepte in Tab. 6) und 5'-Markierung auf Polyacrylamidgelen zweidimensional getrennt und anschließend sequenziert wurden. Es ist lediglich die Position des ersten und letzten Nukleotids des Fragments in der endgültigen PSTV-Primärstruktur (s. Abb. 35) angegeben.

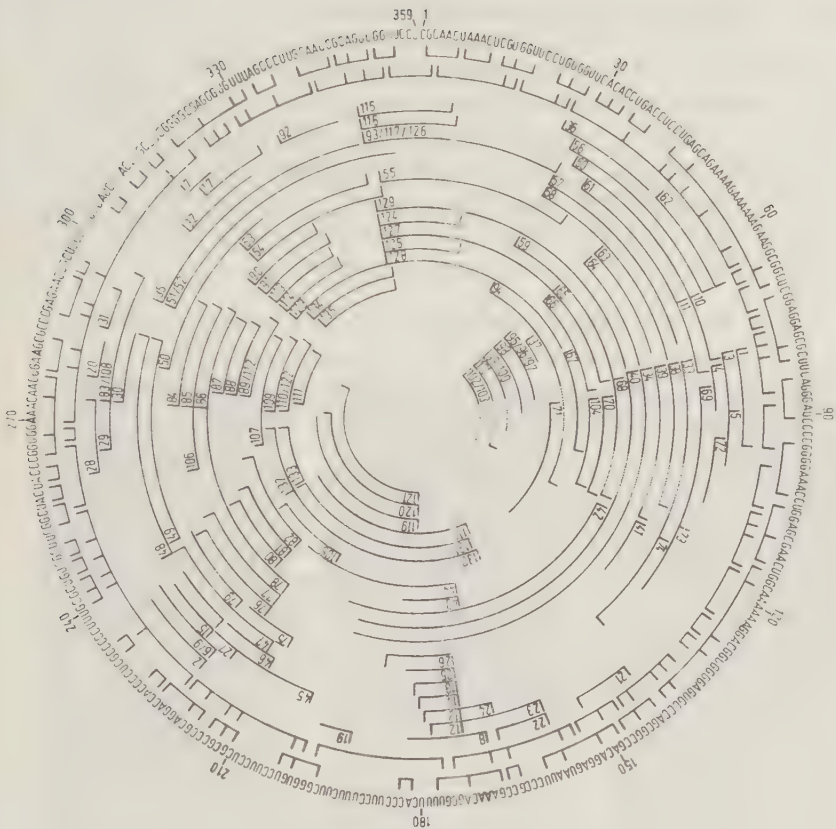


Abb. 35: Primärstruktur von PSTV.
Die Nukleotide wurden im Uhrzeigersinn von 1-359 nummeriert. Die eckigen Klammern in den beiden äußeren Kreisen markieren die Spaltprodukte nach vollständiger Spaltung mit RNase A bzw. RNase T₁. Die aus den verschiedenen Partialspaltungen erhaltenen Fragmente tragen die Nummerierung aus den Tabellen 3 und 4.
[]: Sequenz eines vollständig analysierten Fragments;
—: lesbarer Teil der Sequenz eines Fragments;
.....: nicht lesbarer Teil einer Sequenz.

3.2.3. Primär- und Sekundärstruktur von PSTV (60)

3.2.3.1. Erstellung der Primärstruktur

Die Verknüpfung und Überlappung aller sequenzierten Fragmente, die aus den vollständigen und kontrollierten Spaltungen von PSTV erhalten worden waren, ergab eindeutig die in Abb. 35 dargestellte Nukleotidsequenz: Die Primärstruktur von PSTV ist also ein kovalent geschlossener Ring, der aus 359 Ribonukleotiden (73 x Adenosin, 108 x Cytidin, 101 x Guanosin und 77 x Uridin) aufgebaut ist.

Damit war der endgültige Beweis für die bereits früher aus elektronenmikroskopischen, physikalischen und biochemischen Befunden erschlossene Ringstruktur eines Viroids (15) erbracht worden.

Eine von C. Lossow und P. Jank in diesem Labor später durchgeführte Sequenzanalyse langer Fragmente, welche durch kontrollierte Spaltungen mit der unbekannten Nuklease, die in bakterieller alkalischer Phosphatase enthalten ist (59), und mit Nuklease aus Staphylococcus aureus (76) erhalten worden waren, konnte die in Abb. 35 dargestellte Primärstruktur von PSTV bestätigen.

3.2.3.2. Ableitung der Sekundärstruktur

Bei der gemeinsam in diesem Labor durchgeführten Ableitung der Sekundärstruktur wurde zu Beginn von Beobachtungen ausgegangen, die sich aus RNase T_1 - Fingerprints ergaben, die mit kontinuierlich verringerten Enzymmengen angefertigt worden waren (Abb. 36):

Hier sah man - berücksichtigte man einmal nicht die kurzen Oligonukleotide -, daß bei leicht verminderten Enzymkonzentration ($1/6$ RNase $T_1 \triangleq 0,1$ E RNase T_1 pro $0,1 A_{260}^-$ Einheit RNA $\triangleq$ Rezept T_1 ① in Tab. 6) als erstes die

Oligonukleotide T-23 (CUUCAG), T-26 (AUCCCCG) und T-27 (AAACCUG) vom Fingerprint verschwinden, als nächstes, bei $1/30$ RNase T_1 ($\hat{=}$ 0,02 E RNase T_1 pro 0,1 A_{260} -Einheit RNA, allerdings auch nur $2/3$ der Inkubationsdauer $\hat{=}$ Rezept T_1 ② in Tab. 6), die Oligonukleotide T-31 (CCCCUUUG) und T-37 (ACCACCCUCG) und schließlich, wenn die Enzymkonzentration noch weiter reduziert wurde ($1/120$ RNase T_1 $\hat{=}$ 0,005 E RNase T_1 pro 0,1 A_{260} -Einheit RNA in Gegenwart von 0,5 M NaCl $\hat{=}$ Rezept T_1 ③ in Tab. 6),

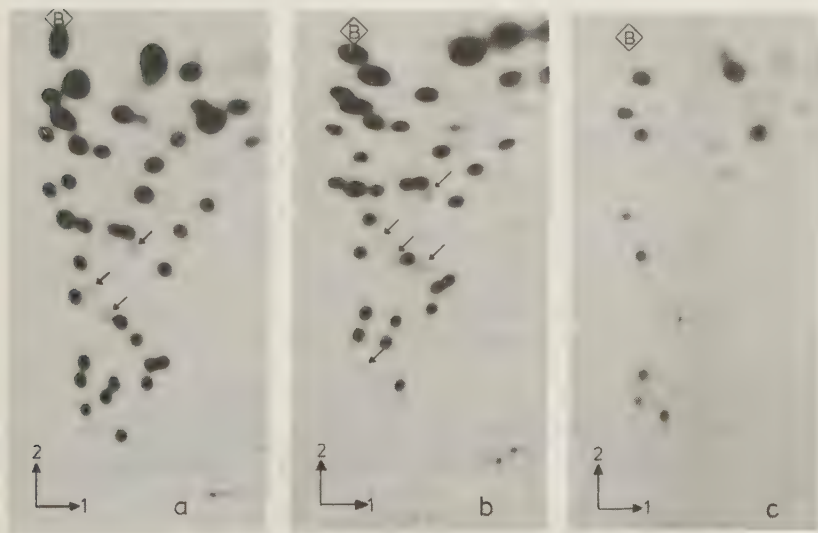


Abb. 36: RNase T_1 - Fingerprints von PSTV mit von (a) über (b) nach (c) abnehmenden Enzymmengen (Spaltrezepte T_1 ① (a), T_1 ② (b) und T_1 ③ (c) in Tab. 6). Die zweidimensionale Auftrennung durch Hochspannungselektrophorese und Homochromatographie war wie in Abb. 12. Die Pfeile bei (a) und (b) deuten auf Oligonukleotide, die parallel zur Abnahme der RNase-Konzentration verschwinden.
B = Lage des Xylen-Cyanol-Farbstoffs.

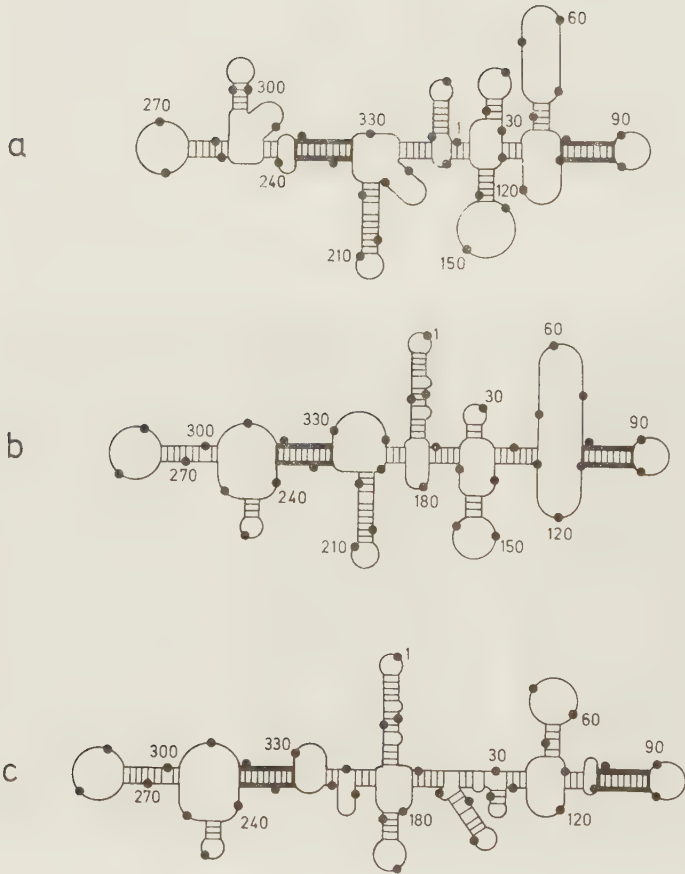


Abb. 37: Sekundärstrukturmodelle von PSTV, die zu globulären Strukturen führen.
 Zahl der Basenpaare: (a): 80 Basenpaare,
 (b): 81 Basenpaare,
 (c): 89 Basenpaare.
 Die dicken Balken markieren besonders stabile Bereiche.

nur noch die Oligonukleotide T-10 (AAG), T-19 (AAAAG), T-29 (AAAAAAG) und T-33 (AAACAACUG) relativ stark, d. h. deutlich sichtbar waren.

Deshalb - so wurde anfänglich gefolgert - sollten die Polypurinsequenz ($_{48}$ AGAAAAGAAAAAGAAGG $_{65}$), welche die Oligonukleotide T-10, T-19 und T-29 einschließt, und auch das Oligonukleotid T-33 in exponierten, einzelsträngigen Bereichen liegen, die Oligonukleotide T-23, T-26, T-27, T-31 und T-37 jedoch in basengepaarten Regionen. Die nach diesen Kriterien erstellten Sekundärstrukturmodelle, dargestellt in Abb. 37, konnten jedoch nicht befriedigen, da

- a) dadurch die Oligonukleotide AUCCCCG (T-26) und AAACCUG (T-27) wiederum sehr exponiert liegen würden. Dies wäre mit den Befunden, die sich aus Abb. 36 und aus der unterschiedlichen Reaktivität der Cytidine in PSTV gegenüber Bisulfit (67) ergaben, nicht vereinbar gewesen;
- b) die Gesamtstruktur von PSTV nach diesen Sekundärstrukturmodellen eigentlich mehr globulären Charakter erhalten würde, was dem gefundenen Achsenverhältnis von ca. 20 (Ref. 15) widersprechen würde.

Die Suche nach Strukturen mit anderer und weitergehender Basenpaarung führte schließlich zu dem in Abb. 38 dargestellten Sekundärstrukturmodell von PSTV:

Das stäbchenförmige Viroidmolekül wird durch eine alternierende Reihenfolge von doppelhelikalen Bereichen und nichtbasengepaarten schleifenbildenden Regionen charakterisiert. Eine Struktur dieser Art ist bereits sehr früh aus der hohen Reaktivität der Mehrheit der Cytidine von PSTV gegen Bisulfit (67) und aus der Tatsache, daß die Oligonukleotide aus vollständigen RNase T₁ - bzw. RNase A - Spaltungen (Tab. 2) wenig komplementäre Sequenzen enthalten, erschlossen worden (67).

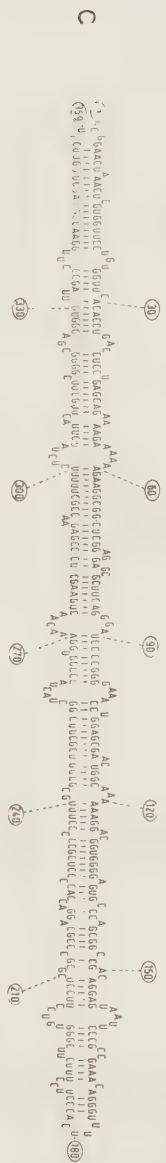


Abb. 38: Sekundärstruktur-Modell von PSTV mit maximaler Basenpaarung (124 Basenpaare). Dieses Strukturmodell entspricht einem Molekül mit einem Achsenverhältnis von ca. 1:23.
(a): Einfaches Viroidmodell; ein Gummiring wurde zu einer Doppelspirale verdreht.
(b): Basenpaarungen im Viroid-Molekül werden durch Striche angezeigt.
(c): Detaillierte Sekundärstruktur.

Die beiden einander komplementären Hälften von PSTV haben ziemlich die gleiche Länge, 179 bzw. 180 Nukleotide. Der Sequenzbereich 1 - 179 enthält 50 x Adenosin, 26 x Uridin, 59 x Guanosin und 44 x Cytidin, der Bereich von Nukleotid 180 - 359 23 x Adenosin, 51 x Uridin, 42 x Guanosin und 64 x Cytidin. Daraus ergeben sich 73 G:C -, 36 A:U - und 15 G:U - Paare, d. h. insgesamt 124 Basenpaare.

Unter Berücksichtigung von Röntgenstrukturdaten für doppelsträngige RNA (77) leitet sich für das hier vorgeschlagene Modell ein Achsenverhältnis von ca. 1:23 ab.

3.2.3.3. Diskussion der Viroid-Struktur

Die erstellte Primärstruktur von PSTV bestätigt endgültig, daß das "potato spindle tuber viroid" ein ringförmiges, kovalent geschlossenes Ribonukleinsäure-Molekül ist, genauso wie dies schon durch die Untersuchung der thermischen Denaturierung, durch Elektronenmikroskopie und durch Endgruppenanalyse ermittelt worden war (15).

Untersuchungen an einigen weiteren Viroiden haben bestätigt, daß zumindest diese untersuchten Viroide ebenfalls Ringstrukturen haben (15, 62, 78). Die Zirkularität scheint somit möglicherweise ein gemeinsames Kennzeichen aller Viroide zu sein.

Andere einzelsträngige zirkuläre Ribonukleinsäuren sind bisher in der Natur nicht gefunden worden.

Diese Befunde der Zirkularität von Viroiden stehen allerdings im Gegensatz zu anderen Veröffentlichungen, in denen gezeigt worden war, daß in infizierten Pflanzen neben zirkulärer auch lineare Viroid-RNA vorliegt:

McClements und Kaesberg glauben dabei außerdem herausgefunden zu haben, daß die lineare Form eine größere Kettenlänge besitzt als die zirkuläre (79). In der Gruppe um T.O. Diener findet man stets unterschiedliche Populationen, d. h. unterschiedliche Gemische von linearen und zirkulären Molekülen, wobei die lineare Form zwischen 30 und 80 % des isolierten Materials stellt (80, 81).

Diese Befunde müssen jedoch sehr kritisch betrachtet werden, da die entsprechenden Viroidpräparationen während der dort durchgeführten Reinigungsprozeduren für längere Zeit in Gegenwart von 3 mM Mg^{++} und alkalischem Puffer (pH 9,0) bei erhöhter Temperatur vorlagen (5, 82, 83). Der unterschiedliche und zum Teil relativ hohe Anteil linearer Viroid-Moleküle rührt aller Wahrscheinlichkeit nach von einer Mg^{++} -katalysierten Spaltung (84) zirkulärer Viroid-RNA her.

In der Tat erhielten auch Sänger et al. (85) durch Behandlung zirkulärer Viroid-RNA mit 5 mM Mg^{++} bei pH 9,0 sowohl bei Raumtemperatur als auch bei erhöhter Temperatur lineare Viroid-RNA. Bei Anwendung der speziellen Reinigungsprozeduren der anderen Autoren (5, 82, 83) wurde je nach den Versuchsbedingungen 40 bis 70 % lineare Viroid-RNA erhalten.

Nach einer Mg^{++} -freien Reinigungsprozedur in Gegenwart von Na_2EDTA (15, 86) enthält die Viroid-Präparation nur ca. 1 % lineare Moleküle, wobei jedoch im Augenblick noch nicht entschieden werden kann, ob diese auf die Aktivität unspezifischer Nukleasen zurückgeführt werden müssen oder ob sie echte Zwischenprodukte der Viroid-Replikation darstellen.

Modifizierte Nukleotide, ein gemeinsames Merkmal von transfer-, ribosomalen und messenger-Ribonukleinsäuren konnten in PSTV bisher nicht nachgewiesen werden. Diese Aussage gilt jedoch streng genommen nur für ca. 1/3 aller

Nukleotide, nämlich für die 5'-ständigen Endgruppen aller analysierten, durch verschiedene enzymatische Spaltungen erhaltenen, Oligonukleotide. Es ist also durchaus möglich, daß ein oder mehrere modifizierte Nukleotide, die nach keiner der durchgeführten Spaltungen in der 5'-endständigen Position eines Oligonukleotids lokalisiert waren, bisher noch nicht entdeckt und identifiziert werden konnten.

Hadidi und Keith haben in PSTV 1 - 1,2 Mol % modifizierter Nukleotide gefunden; nach einem nicht näher definierten Alterungsprozess der Viroid-RNA in der Pflanze, wobei die Viroid-RNA angeblich auch gegen die Ribonukleasen T_1 , T_2 , A und die Nuklease P_1 resistent wird, sollen sogar 90 % der Viroid-Ribonukleotide modifiziert sein (87). Im Gegensatz dazu zeigen die von Morris mit ^3H -Methyl-Methionin durchgeführten in vivo - Methylierungsversuche keinen signifikanten Einbau von ^3H -Methylgruppen in PSTV (88).

Ein weiteres Charakteristikum von PSTV ist eine Folge von 18 Purinen, vornehmlich Adenosinen (Nukleotide 48 - 65 in Abb. 35). Ähnliche Sequenzen konnten auch in anderen Viroiden nachgewiesen werden (s. u.): sie könnten daher ein gemeinsames strukturelles Merkmal aller Viroide darstellen. Aus diesem Grund wurde die Numerierung der Nukleotide in PSTV so durchgeführt, daß sich Nukleotid Nr. 1 in derjenigen Schleife des Viroids befindet, die links (d. h. in 5'-Richtung) von dieser Polypurin-Sequenz liegt.

Die in Abb. 38 dargestellte Sekundärstruktur von PSTV zeigt nicht nur ein Maximum an Basenpaaren, sondern wird auch durch die spezifischen Schnittstellen bestätigt, die mit verschiedenen Nukleasen erhalten werden konnten und die fast ausnahmslos (d. h. zu ca. 90 %) in Einzelstrangbereichen dieses Sekundärstruktur-Modells lokalisiert sind (60). Ebenso liegen die durch Bisulfit schwer bzw. leicht

modifizierbaren Cytidine (67) in basengepaarten bzw. einzelsträngigen Regionen, was als weitere Bestätigung für die hier vorgeschlagene Sekundärstruktur betrachtet werden kann.

Nach diesem Modell enthalten die beiden entstehenden Schleifen von PSTV die Sequenzen UCG (Nukleotide 359 - 2), bzw. UCA (Nukleotide 180 - 182). Dies sind Sequenzen, die bei allen tRNAs, die bei der Proteinbiosynthese an der Elongation der Peptidkette teilnehmen können, in derjenigen Schleife gefunden werden, die mit der ribosomalen 5S RNA in Wechselwirkung tritt (89).

Durch Röntgenstrukturanalysen ist nun gezeigt worden, daß beispielsweise in Hefe-tRNA^{Phe} das N7-Atom des Guanosins 57 eine Wasserstoffbrückenbindung mit der 2'-OH-Gruppe der Ribose von Pseudouridin 55 eingeht (90, 91).

Eine ähnliche Wasserstoffbrücke wurde auch zwischen dem 2'-OH des universellen Uridins an der 3'-Seite des Anticodons und dem zweiten Nukleotid des Anticodons von tRNA gefunden (91). In beiden Fällen stabilisiert diese Wasserstoffbrücke die Schleifenstruktur genau an der Stelle, wo die Polynukleotidkette eine Biegung von 180° macht, und in beiden Fällen ist das 2'-OH der Ribose von Uridin bzw. Pseudouridin an dieser Wechselwirkung beteiligt. Man hat daher solche Strukturen als "Uridin-turn" ("U-turn") bezeichnet und hält sie für ein allgemeines Strukturmerkmal in tRNA. Es ist allerdings noch nicht bekannt, ob diese "U-turns", das gemeinsame Element der T ψ C- und Anticodon-Schleifen in tRNA, auch in anderen Ribonukleinsäuren vorkommen (91).

Ob die Sequenzen UCG und UCA in den beiden Schleifen von PSTV die 180° -Wendung der Polynukleotidkette auch hier mittels einer entsprechenden Wasserstoffbrücke stabilisieren, wurde bisher noch nicht untersucht. Für eine tRNA von ungewöhnlicher Struktur ist zumindest kürzlich gezeigt worden, daß diese Wasserstoffbrücke fehlt, obwohl die Sequenz UCG in der Schleife IV vor-

handen ist (92).

Eine der interessantesten Fragen, die sich nach der Ermittlung der Primärstruktur eines Viroids ergibt, ist, ob Viroide für Peptide oder Proteine codieren. Frühere Versuche, PSTV und CEV in Protein umzuschreiben, blieben in verschiedenen in vitro - Systemen erfolglos (93). Darüberhinaus hemmt Viroid-RNA auch nicht die in vitro - Translation von Globin-mRNA (94).

Das Fehlen einer solchen Interferenz bedeutet, daß (a) PSTV nicht an die ribosomale 5S RNA bindet, obwohl in beiden Schleifen eine UCG- bzw. UCA-Sequenz vorhanden ist wie in der Ribosomenbindungssequenz (Schleife IV) von tRNA, und daß (b) PSTV auch nicht die mRNA vom Ribosom verdrängt.

Die ringförmige Anordnung der 359 Nukleotide im PSTV-Molekül hat zur Folge, daß der ursprüngliche Leseraster erst nach 3 Translationsrunden wieder erreicht würde. Es fehlt zwar in der Nukleotidsequenz von PSTV - neben einigen anderen Codons - das häufig verwendete Initiator-Triplett AUG, jedoch sind sieben mögliche GUG-Initiator- und sechs mögliche Terminator-Codons vorhanden (Abb 39). Demnach wäre die Synthese sieben verschiedener Peptide bzw. Proteine möglich, bzw. sogar deren elf, wenn man die Möglichkeit in Betracht zieht, daß der schwache Terminator UGA überlesen werden kann. Tab. 5 gibt eine Aufstellung sowohl der theoretisch translatierbaren Sequenzen von PSTV, als auch der, daraus hypothetisch resultierenden Peptide und Proteine.

Allerdings muß hier auch bemerkt werden, daß GUG in Eukaryonten bisher nicht als Initiator-Codon gefunden wurde, und auch nicht als solches zu fungieren scheint (95 - 97).

Über mögliche, den GUG-(Initiator-)Triplett vorausgehende Ribosomenbindungssequenzen, wie das Tetranukleotid

AGGA, das des öfteren in mRNA-Sequenzen im 5'-nahen, nicht translatierten Bereich vor dem Initiator-Triplett auftritt (98, 99) und das im PSTV-Molekül nur zwei Nukleotide von GUG 129 - 131 entfernt ist, soll hier nicht weiter diskutiert werden. Die von Shine und Dalgarno aufgestellte Hypothese einer spezifischen Wechselwirkung zwischen einer solchen Sequenz und einer komplementären Sequenz am 3'-Ende der ribosomalen 16S RNA (99, 100) ist jedoch für Eukaryonten nicht unumstritten, da hier ähnliche spezifische Wechselwirkungen, wenn überhaupt, dann möglicherweise auf andere Art stattfinden. Schließlich fehlt dem Viroid die den meisten eukaryotischen mRNAs gemeinsame "cap"-Struktur, die zumindest bei vielen mRNAs für die Translation sowohl in vitro als auch in vivo notwendig ist (101 - 103).

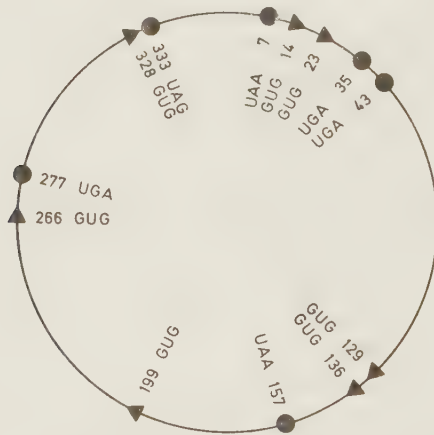


Abb. 39: Mögliche Start (▲) - und Terminator (●) - Triplets in PSTV. Die Nummern (s. Abb. 35) beziehen sich jeweils auf das erste Nukleotid der entsprechenden Triplets.

Nr.	a	b
1	14 - 35	6
2	23 - 35	3
3	129 - 333	67
4	136 - 157	6
5	199 - 277	25
6	266 - 333	141
7	328 - 35	21
8	14 - 333	225
9	23 - 333	222
10	199 - 333	283
11	328 - 333	240

Tab. 5: Mögliche translatierbare Sequenzen von PSTV (a), wobei jeweils die Positionen des ersten Nukleotids des Initiator- und des Terminator-Codons angegeben sind, und Länge (b), d. h. Anzahl der enthaltenen Aminosäuren, der daraus resultierenden Peptide bzw. Proteine.
Die Proteine Nr. 8 - 11 würden nur beim Überlesen des schwachen Terminators UGA möglich werden.

Auch das GC:CG-Verhältnis zeigt keine Ähnlichkeit zu den in eukaryotischen messenger-RNAs gefundenen. In diesen scheint sich nämlich im Lauf der Evolution eine starke Selektion gegen CG-Nachbarn entwickelt zu haben (104). So beträgt das Verhältnis von GC- zu CG-Nachbarn in menschlicher und Kaninchen- β -Globin-mRNA 10:1 (105, 106), in den mRNAs von SV40 für VP1 25:1 (107) bzw. für VP2 und VP3 30:1 (108). Im Gegensatz dazu ist das GC:CG-Verhältnis in PSTV 1:1 (genau 25:24).

Aus all dem schließen zu wollen, daß Viroide in den Chloroplasten, den prokaryotischen Elementen höherer Pflanzen (109), translatiert würden, wäre jedoch eine reine Spekulation.

Natürlich kann man auch die Möglichkeit in Betracht ziehen, daß PSTV eine nicht-codierende Minus-Strang-RNA darstellt (62, 110). Eine daraus sich ergebende, PSTV-komplementäre, allerdings bisher hypothetische Plus-Strang-RNA würde sehr ähnliche physikochemische Eigenschaften wie PSTV besitzen, d. h. annähernd gleiche

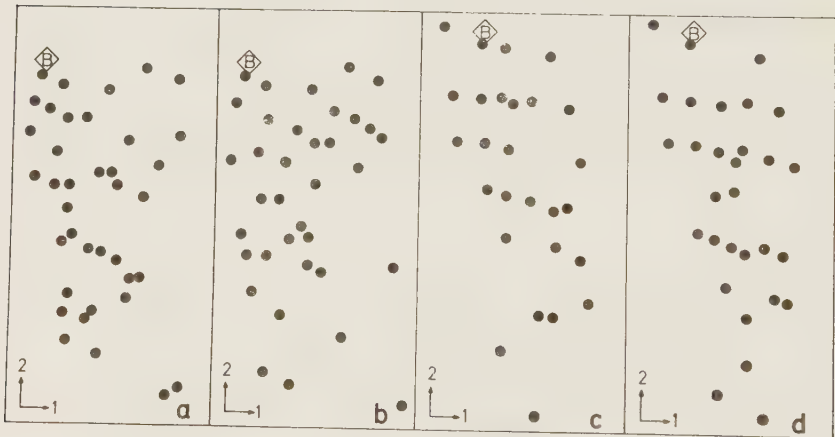


Abb. 40: Für den Fall, daß in der Pflanze eine komplementäre PSTV-RNA existiert, werden hier die schematischen Fingerprints von PSTV und der komplementären RNA gegenübergestellt.
 (a): RNase T_1 - Fingerprint von PSTV
 (b): RNase T_1 - Fingerprint von "komplementärem PSTV"
 (c): RNase A - Fingerprint von PSTV
 (d): RNase A - Fingerprint von "komplementärem PSTV"

Die Lage der Oligonukleotide in (a) und (c) wurde von Abb. 12 direkt übertragen, die Lage der Oligonukleotide in (b) und (d) mit Hilfe der Daten von den PSTV-Fingerprints und den PSTV-Oligonukleotidsequenzen nach einem von Domdey et al. beschriebenen Schema (67) bestimmt.

gelelektrophoretische Mobilität, einen nur geringfügig niedrigeren Schmelzpunkt verbunden mit einer etwas weniger ausgeprägten Kooperativität (62). Ein eindeutiges und leicht erstellbares Unterscheidungsmerkmal wäre allerdings die Fingerprintanalyse einer solchen, bisher hypothetischen komplementären RNA. Abb. 40 zeigt in schematischer Form die deutlichen Unterschiede der RNase T_1 - und RNase A - Spaltmuster von PSTV und einer PSTV-komplementären RNA. Außerdem kann man daraus und aus den Autoradiographien der RNase T_1 - und RNase A - Fingerprints von PSTV in Abb. 12 sehen, daß das hier analysierte Viroid mit keiner dazu komplementären RNA, welche - wie bereits festgestellt wurde - eine sehr ähnliche gelelektrophoretische Mobilität zeigen würde, kontaminiert ist.

In einer codierenden PSTV-komplementären Sequenz ("Plus-Strang-RNA") gäbe es wiederum vier GUG-(Initiator-) und neun Terminator-Tripletts, nämlich 4 x UAG, 2 x UAA und 3 x UGA (110). Solange jedoch noch keinerlei glaubhafte Hinweise auf Viroid-spezifische Proteine in infizierten Wirtspflanzen vorliegen, sind auch solche Spekulationen wertlos.

An dieser Stelle müssen auch die Versuche anderer Gruppen erwähnt werden, komplementäre RNA- oder DNA-Sequenzen in den Viroid-Wirtspflanzen durch Hybridisierungsexperimente nachzuweisen.

So berichten Hadidi et al. (111), daß PSTV zu 60 % an DNA von Nachtschattengewächsen hybridisiert, seien diese nun infiziert oder nicht, nur zu 30 % an DNA von *Gynura aurantiaca*, allerdings auch bis zu 60 % an die DNA von der phylogenetisch nicht direkt verwandten Bohne und von *Physalis peruviana*, welche keine Wirtspflanzen von PSTV sind. Der letztgenannte Befund könnte eventuell auf eine mindere Qualität der beschriebenen Versuche hinweisen; außerdem war die Viroid-RNA sehr schlecht gereinigt.

Von ähnlich geringem Wert könnten weiterhin die Experimente sein, die gezeigt haben, daß synthetische cDNA von PSTV nicht nur gut an PSTV hybridisiert, sondern ebenso gut an Satelliten-RNA des "Tobacco ringspot virus" (36).

Zum anderen finden Grill und Semancik in CEV-infizierten Gynura-Pflanzen CEV-komplementäre RNA, jedoch keine CEV-komplementäre DNA (112). Allerdings könnte diese komplementäre RNA durch einen Artefakt linearisiertes CEV sein, da auch CEV-Dimere sehr stabil sein müßten; auf wichtige und relevante Kontrollversuche wurde hier allerdings verzichtet.

Die generelle Regel, daß infektiöse Nukleinsäuren die Information für Pathogen-spezifische Proteine enthalten, muß nicht unbedingt für Viroide gelten. Daraus würde auch folgen, daß Viroid-Replikation und Viroid-Zirkulation vollständig von präexistenten Wirtsenzymen abhängen. Die Pathogenität des Viroids könnte sich aus einer direkten Wechselwirkung mit bestimmten Bestandteilen und/oder Stoffwechselwegen des Wirts ergeben und sich allein aus der besonderen Struktur ableiten. Zweifellos enthält die hier vorgestellte Struktur von PSTV die noch unerkannten Erkennungsregionen für replizierende und den Ring schließende (RNA-Ligase) Enzyme.

Schließlich soll noch darauf hingewiesen werden, daß die erhaltene Primär- und Sekundärstruktur von PSTV keinerlei Hinweise auf eine mögliche Tertiärstruktur liefert.

Das für das Sekundärstrukturmodell, unter Berücksichtigung der Röntgenstrukturdaten für doppelsträngige RNA (77), berechnete Achsenverhältnis von ca. 1:23 befindet sich in guter Übereinstimmung mit dem durch Ultrazentrifugation gefundenen hydrodynamischen Wert von ca. 1:20 (Ref. 15) und dem durch elektronenmikroskopische Untersuchungen erhaltenen von ca. 1:18,5 (Ref. 15, 62). Letzterer Wert ist insofern etwas niedriger, als im Elektronenmikroskop terminale Knoten am Viroid-Molekül sichtbar sind, die jedoch als Artefakte, die während des Spreitens und Fixierens auf-

treten, betrachtet werden (62).

Wegen dieser Übereinstimmung der elektronenmikroskopischen und hydrodynamischen Daten mit dem aus der vorliegenden Sekundärstruktur berechneten Achsenverhältnis sind Tertiärstruktur-Wechselwirkungen bei PSTV kaum vorstellbar.

3.3. Vergleich von drei Pflanzen-Viroiden anhand ihrer Fingerprints (86)

Um zu klären, ob aus verschiedenen Wirten isolierte Viroide identisch sind oder nicht, wurden die Oligonukleotidmuster von Citrus Exocortis Viroid (CEV), Potato Spindle Tuber Viroid (PSTV) und Chrysanthemum Stunt Viroid (CSV) verglichen.

Diese drei Viroide stammen von den botanisch nicht miteinander verwandten Wirtspflanzen Citrus, Kartoffel und Chrysantheme. Für ihre Massenvermehrung wurden sie auf experimentell günstige Wirtspflanzen adaptiert: CEV auf Gynura aurantiaca DC (CEV-gyn), PSTV auf Tomate, cv. Rentita (PSTV-tom) und CSV auf Cineraria hybrida, cv. Hansa (CSV-cin).

Im Falle von CEV besteht zwischen dem natürlichen und dem experimentellen Wirt keine Verwandtschaft. Hingegen besteht eine nahe Verwandtschaft bei den beiden Wirtspflanzen von PSTV, Kartoffel und Tomate (beide Nachtschattengewächse), und den beiden Wirten von CSV, Chrysantheme und Cineraria (beide Compositen). Darüberhinaus sind die beiden experimentellen Wirtspflanzen von CEV und CSV, Gynura und Cineraria, nah verwandte Compositen.

Trotz gewisser Wirts-abhängiger Unterschiede verursachen diese drei Viroide die gleichen Symptome, nämlich Verkrümmung der Blätter und Hemmung des Wachstums (8, 113 - 117). Diese gemeinsamen charakteristischen Symptome verschiedener Viroide, im besonderen, wenn sie auf dem gleichen Wirt adaptiert worden waren, hatten zu der Hypothese geführt, daß Viroide von ursprünglich verschiedenen Wirten eventuell identisch sein könnten (118, 119).

Abb. 41 zeigt die RNase T₁ - und RNase A - Fingerprints der drei untersuchten Viroide, wie sie nach Spaltung mit RNase A bzw. RNase T₁, 3'-Dephosphorylierung, in vitro

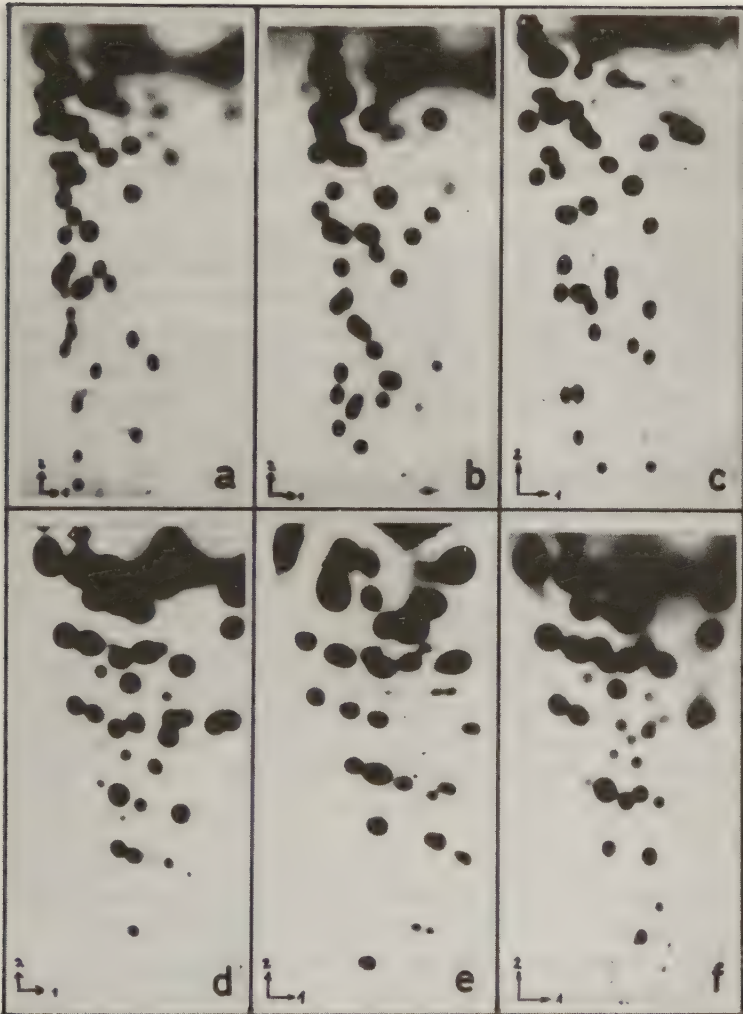


Abb. 41: Autoradiographien der Oligonukleotidmuster dreier Viroide.
Die Fingerprints wurden durch Ribonuklease-Spaltungen von CEV-gyn (a, d), PSTV-tom (b, e) und CSV-cin (c, f) erhalten.
(a), (b), (c): RNase T_1 - Fingerprints;
(d), (e), (f): RNase A_1 - Fingerprints.
Die zweidimensionale Auftrennung erfolgte entsprechend der in Abb. 12.
B = Lage des Xylen-Cyanol-Farbstoffs.

5'-³²P-Phosphorylierung der Oligonukleotide mit T4-Poly-nukleotidkinase, zweidimensionaler Auftrennung über Hochspannungselektrophorese/Homochromatographie und anschließender Autoradiographie erhalten wurden.

Hieraus zeigt sich folgendes:

- a) Die Fingerprints der drei Viroide CEV-gyn (Abb. 41 a und d), PSTV-tom (Abb. 41 b und e) und CSV-cin (Abb. 41 c und f) zeigen signifikante und charakteristische Unterschiede sowohl im RNase T₁ - als auch im RNase A - Spaltmuster. Dies beweist die Individualität dieser drei verschiedenen, hier untersuchten Viroide.
- b) Aus der Anzahl und der relativen Intensität der auf den Autoradiogrammen sichtbaren Oligonukleotide kann geschlossen werden, daß sich die Kettenlänge der drei Viroide in der gleichen Größenordnung bewegt, d. h. daß auch CEV-gyn und CSV-cin aus ca. 360 Nukleotiden (± 10 %) bestehen.
- c) Lediglich ein gemeinsames Merkmal lassen die drei Viroide bisher erkennen: Wie die RNase A - Fingerprints zeigen, enthalten alle drei analysierten Viroide eine Polypurin-Sequenz, die hauptsächlich Adenosine enthält und aus ca. 15 Nukleotiden besteht.

Die betreffs der Größe von Viroid-RNA erzielten Ergebnisse stimmen recht gut mit den von Sänger et al. (15) und Henco et al. (120) ermittelten Molekulargewichtsdaten überein. Sie bestätigen und erweitern die von Dickson et al. erzielten Befunde der Individualität verschiedener Viroide (38). Es zeigt sich jedoch im Vergleich mit dieser Arbeit (38) auch deutlich die Problematik vergleichender Fingerprintanalysen von in vitro mit ¹²⁵Jod markierter RNA. Auch die Ergebnisse neuerer Arbeiten von Dickson et al. machen deutlich, daß mit Hilfe der ¹²⁵J-Markierung nur

beschränkte Aussagen selbst bei vergleichenden Finger-
printanalysen möglich sind (39, 40).

Die Individualität zweier Viroide, nämlich von CEV-gyn
und CSV-chr wurde auch jüngst von Palukaitis und Symons
durch Hybridisierungsversuche mit entsprechenden cDNAs
gezeigt (78).

Detaillierte Aussagen über Sequenzhomologien allein
durch Hybridisierungsversuche, wie sie von Owens et al.
(13) gemacht wurden, nämlich, daß PSTV und CSV 60
Nukleotide, PSTV und Columnea-Viroid 150 Nukleotide ge-
meinsam haben, erscheinen allerdings aufgrund der ver-
wendeten Methode als unzulässig.

Daß Viroide gemeinsame strukturelle Eigenschaften be-
sitzen, kann jedoch aus den hier durchgeführten
Fingerprintanalysen bereits geschlossen werden.
Fingerprintanalysen und schließlich auch Sequenz-
analysen dieser und auch weiterer Viroide werden je-
doch notwendig sein, um gemeinsame Strukturelemente
und die Zusammenhänge zwischen Struktur und Funktion
(Wirtsspezifität, Pathogenität, Replikation etc.)
aufzufinden.

4. Experimenteller Teil

4.1. Material und Geräte

4.1.1. Materialien

Material	Bezugsquelle
a) <u>Enzyme:</u>	
Ribonuklease T ₁ aus <u>Aspergillus oryzae</u> (E.C. 3.1.4.8)	Sankyo Co. Ltd. Tokyo
Ribonuklease T ₂ aus <u>Aspergillus oryzae</u> (E.C. 3.1.4.23)	
Ribonuklease U ₂ aus <u>Ustilago sphaerogena</u> (E.C. 3.1.4.-)	
Ribonuklease A aus Rinderpankreas (E.C. 3.1.4.22)	Boehringer Mannheim
alkalische Phosphatase aus <u>E. coli</u> (E.C. 3.1.3.1)	
alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (E.C. 3.1.3.1)	
Hexokinase aus Hefe (E.C. 2.7.1.1)	
3'-Phosphoglyceratkinase aus Hefe (E.C. 2.7.2.3)	
Glycerinaldehyd-3-phosphatde- hydrogenase aus Kaninchenmuskel (E.C. 1.2.1.12)	

Material	Bezugsquelle
Schlangengiftphosphodiesterase aus <u>Crotalus adamanteus</u> (E.C. 3.1.4.1)	Worthington Biochemical Corporation
Nuklease P ₁ aus <u>Penicillium</u> <u>citrinum</u> (E.C. 3.1.4.x)	PL Biochemicals Inc. Milwaukee
5'-Polynukleotidkinase aus T4 Phagen - infizierten <u>E. coli</u> (E.C. 2.7.1.78)	von Dr. D. Wildenauer in diesem Labor isoliert (69, 121)
Ribonuklease Phy I aus <u>Physarum polycephalum</u> (48)	Geschenk von Prof. J. P. Bargetzi (Genf)
Modifizierte ϵ -Carboxymethyl- lysin-41 pankreatische Ribo- nuklease [CM-RNase (122)]	Geschenk von Prof. W. Fiers (Gent)
b) Ribonukleinsäuren und Nukleotide:	
PSTV-tom ("potato spindle tuber viroid" von Tomate) CEV-gyn ("citrus exocortis viroid" von <u>Gynura aurantiaca</u>) CSV-cin ("chrysanthemum stunt viroid" von <u>Cineraria hybrida</u>)	von Prof. Dr. H. L. Sänger (Giessen) isoliert und zur Verfügung gestellt
5S rRNA aus Kaninchenleber	in diesem Labor gereinigt (53)
tRNA aus <u>E. coli</u> 5'-Nukleotide: pA, pC, pG, pU	Boehringer Mannheim

Material	Bezugsquelle
c) <u>Chromatographiematerialien:</u>	
DEAE-Cellulose für Säulen- chromatographie, DE 23	Whatman Biochemicals Ltd.
Bio-Gel P-2 für Säulen- chromatographie	Bio-Rad Laboratories
Cellulose-Fertigplatten für Dünnschichtchromatographie (20 x 20 cm) ohne Fluoreszenzindikator	Merck, Darmstadt
Polygram CEL 300 DEAE/HR-2/15- Platten für Homo- und Gradienten- Dünnschichtchromatographie (20 x 40 cm)	
CEL 400-10 PEI - Platten für Gradienten-Dünnschichtchromato- graphie (20 x 40 cm)	Macherey-Nagel und Co, Düren
Polygram CEL 300 PEI - Fertig- folien für Dünnschichtchromato- graphie (20 x 20 cm)	
d) <u>Trägermaterialien für die Hochspannungselektrophorese:</u>	
Celluloseacetat-Streifen (30 x 550 mm bzw. 30 x 1000 mm)	Schleicher und Schüll GmbH, Dassel
Cellogel-Streifen (30 x 950 mm)	Chemetron, Milano
DE81-Papier (570 x 460 mm)	Whatman Biochemicals Ltd.

Material	Bezugsquelle
e) <u>Radioaktive Substanzen:</u>	
$H_3^{32}PO_4$ trägerfrei	NEN-Chemicals, Dreieichenhein
f) <u>Filme:</u>	
Kodak RP Royal X-Omat (RP/R-54) Röntgenfilm Kodak Ektachrome 64 Diafilm - (ASA 64 / 19 DIN)	Kodak
PR-90 Röntgenfilm	Bero
Agfaortho-25-Professional-Film (ASA 25 / 15 DIN)	Agfa-Gevaert
Dokumol-Entwickler	Tetenal
Verstärkerfolien für Röntgen- filme: Quanta II (35 x 43 cm) und Lightning Plus (20 x 40 cm)	Dupont-Chronex
g) <u>Sonstiges:</u>	
Acrylamid, 2 x kristallisiert N,N'-Methylenbisacrylamid N,N,N',N'-Tetramethyläthylen- diamin (TEMED)	Serva, Heidelberg
Dialyseschläuche	Union Carbide Corp., Chicago

4.1.2. Geräte

Gerät	Hersteller und Typ
Zentrifugen	Heräus Christ, Microfuge HC 102 Heräus Christ, Minifuge Eppendorf Zentrifuge 3200
UV-Spektrometer	Bausch und Lomb, Spectronic 700
Scintillations- spektrometer	Packard, TRI-CARB, Modell 3380 bzw. 3390
Fraktionssammler und Registriergerät	LKB Ultrorac 7000 LKB Uvicord II
Schlauchpumpe	Desaga, Modell 131900
Hochspannungs- elektrophorese	Savant Instruments Inc., Hicksville, New York, Modell 8036

4.2. Methoden

4.2.1. Enzymatische Spaltungen von RNA

4.2.1.1. Enzymatische Spaltungen zur Gewinnung von RNA-Fragmenten

Vollständige Spaltung mit Ribonuklease T_1 bzw. Ribonuklease A:

Ribonuklease T_1 und Ribonuklease A spalten Ribonukleinsäure in relativ kurze, definierte Oligonukleotide. Die beiden Endonukleasen unterscheiden sich in ihrer Spezifität insofern, als RNase T_1 nur nach 3'-Guanosinphosphat, RNase A nur nach dem 3'-Phosphat von Pyrimininen spaltet. Bei beiden Ribonukleasen entstehen intermediär zyklische 2',3'-Phosphate als Zwischenprodukte.

Durch eine sich anschließende Behandlung mit alkalischer Phosphatase werden die am Oligonukleotid 3'-terminalen Phosphatgruppen entfernt. Die alkalische Phosphatase wird anschließend durch Inkubation mit Nitrilotriessigsäure und Erhitzen auf 100°C inaktiviert (31).

Vorschrift:

5 μg (0,1 A_{260} -Einheiten) Viroid-RNA werden mit 0,6 Einheiten RNase T_1 bzw. 0,05 μg RNase A in 17 μl 60 mM Tris-HCl (pH 8,0), 3 h bei 37°C vollständig gespalten. Danach werden 0,002 Einheiten (in 1 μl) alkalischer Phosphatase aus *E. coli* oder aus Kälberdarm zugegeben und es wird weitere 2 h bei 37°C inkubiert (67). Nach Hinzufügen von 3 μl 40 mM Nitrilotriessigsäure (pH 7,2) werden die Proben 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen, 2 min auf 100°C erhitzt und danach in Eis abgeschreckt (31).

Nach der gleichen Vorschrift kann auch 5S rRNA gespalten werden.

Partielle Spaltungen mit verschiedenen Ribonukleasen:

Lange, überlappende Viroid-Fragmente erhält man durch partielle, kontrollierte Spaltungen mit jeweils verschiedenen Enzymen. Die Versuchsbedingungen für die einzelnen enzymatischen Spaltungen sind aus Tab. 6 zu ersehen.

Spezifitäten der einzelnen Enzyme:

CM-RNase (modifizierte ϵ -Carboxymethyllysin-41 pankreatische Ribonuklease) besitzt dabei eine ähnliche Spezifität wie RNase A; sie spaltet bevorzugt Pyrimidin-Purin-Bindungen, wobei Pyrimidin-Adenosin-Bindungen am schnellsten angegriffen werden (122).

Die Spezifität von RNase Phy I aus Physarum polycephalum ist dadurch charakterisiert, daß CpN-Bindungen gegen ihren Angriff relativ resistent sind (32, 47, 48).

Die Ribonuklease-Aktivität in alkalischer Phosphatase aus E. coli rührt wahrscheinlich von einer unbekannten Nuklease her, die als geringe Verunreinigung enthalten ist (53, 59, 60). Die Spezifität ist ähnlich der von CM-RNase (122).

Die Spezifitäten von RNase T₁ und RNase A wurden bereits beschrieben.

Um die Hydrolyse zu beenden und die entstandenen Oligonukleotide vom übrigen Reaktionsgemisch abzutrennen, werden diese mit Äthanol gefällt, wobei sich ein vorheriges Phenolisieren zur Entfernung des Enzyms empfiehlt:

Dazu wird der Reaktionsansatz (30 μ l) mit 70 μ l 50 mM NaAc (pH 5,0) versetzt; dann werden fünf mal je 30 μ l NaAc (50 mM, pH 5,0) - gesättigtes Phenol zugegeben, jeweils gemischt und zentrifugiert. Die phenolischen Phasen werden mit 30 μ l 50 mM NaAc (pH 5,0) nachgewaschen. Die vereinigten wässrigen Phasen enthalten Enzym-freies RNA-Hydrolysat.

Die anschließende Fällung der RNA geschieht in 50 % Äthanol, 0,2 M NaAc (pH 5,0). 10 mM MgCl₂ 2 h bei - 20°C.

a	b	c	d	e	f	g
T ₁ ①	RNase T ₁	0,1 E	16	60 mM TEAB, pH 8,0	3 h	37°C
T ₁ ②	RNase T ₁	0,02 E	16	60 mM TEAB, pH 8,0	2 h	37°C
T ₁ ③	RNase T ₁	0,005 E	10	70 mM NaCl, 50 mM TEAB, pH 8,0	3 h	37°C
T ₁ ④	RNase T ₁	0,01 E	16	0,5 M NaCl, 100 mM TEAB, pH 8,0	2 h	37°C
T ₁ ⑤	RNase T ₁	0,005 E	9	0,1 M NaCl, 100 mM TEAB, pH 8,0	2 h	37°C
A ①	RNase A	0,005 µg	16	60 mM TEAB, pH 8,0	3 h	37°C
A ②	RNase A	0,001 µg	16	60 mM TEAB, pH 8,0	2 h	37°C
A ③	RNase A	0,01 µg	17	0,5 M NaCl, 60 mM TEAB, pH 8,0	2 h	37°C
CM ①	CM-RNase	0,1 µg	10	70 mM NaCl, 50 mM TEAB, pH 8,0	3 h	37°C
CM ②	CM-RNase	0,5 µg	5	0,4 M NaCl, 50 mM TEAB, pH 8,0	2 h	20°C
CM ③	CM-RNase	0,2 µg	5	0,4 M NaCl, 50 mM TEAB, pH 8,0	2 h	20°C
Phy I	RNase Phy I	0,014 E	6	0,5 M NaCl, 70 mM NaAc, 3mM Na ₂ EDTA, pH 4,5	40 min	50°C
AP	bakterielle alkalische Phosphatase	0,3 µg	6	60 mM Tris-HCl, pH 8,0	1 h	55°C

Tab. 6: Bedingungen für die Gewinnung langer Oligonukleotide von PSTV durch Spaltung mit verschiedenen Nukleasen, bezogen auf 0,1 A₂₆₀-Einheiten (5 µg) RNA.

- (a): Bezeichnung des Spaltansatzes
- (b): eingesetzte Nuklease
- (c): Enzymmenge pro 0,1 A₂₆₀-Einheit RNA
- (d): Reaktionsvolumen in µl
- (e): Puffer
- (f): Inkubationsdauer
- (g): Inkubationstemperatur

Die kontrollierte Spaltung mit der in bakterieller alkalischer Phosphatase enthaltenen Ribonuklease (AP) wurde nur zur Gewinnung langer Fragmente von 5S rRNA verwendet.

4.2.1.2. Enzymatische Spaltungen 5'-³²P-markierter Oligonukleotide zur Sequenzanalyse

5'-Endgruppenbestimmung durch vollständige Spaltung der 5'-markierten Oligonukleotide mit Nuklease P₁:

Nuklease P₁ aus Penicillium citrinum ist eine weitgehend unspezifische Endonuklease, die als Endprodukt 5'-Mononukleotide liefert (123). Wegen der radioaktiven Markierung der Oligonukleotide an ihrem 5'-Ende kann nach deren vollständiger Spaltung und dünnsschichtchromatorgraphischer Auftrennung das endständige 5'-Nukleotid wegen der ³²P-Markierung erkannt und bestimmt werden.

Inkubationsansatz für eine vollständige Spaltung:

Zusammen mit dem 5'-³²P-markierten Oligonukleotid werden 5 ng RNase P₁ pro A₂₆₀-Einheit RNA in 10 µl 50 mM NH₄Ac (pH 5,3) 2 h bei 50°C inkubiert.

Vollständige Spaltung der 5'-markierten Oligonukleotide mit RNase T₁ oder mit RNase A für die Fingerprintanalyse mittels "sekundärer" Phosphorylierung (53):

Auch von RNA-Fragmenten, die nur in Nanogramm-Mengen vorliegen, können Fingerprintanalysen angefertigt werden. Dazu wird das durch RNA-freie elektrophoretische Elution aus dem Gel isolierte 5'-markierte Oligonukleotid (1 - 50 ng RNA) mit 0,1 Einheiten RNase T₁ bzw. 5 ng RNase A in 2 µl 70 mM Tris-HCl (pH 8,0) 2 h bei 37°C inkubiert. Nach einer einstündigen Behandlung mit 0,0002 Einheiten (in 0,25 µl) alkalischer Phosphatase aus E. coli, deren anschließender Inaktivierung durch Zugabe von 0,4 µl 40 mM Nitrilotriessigsäure (pH 7,2), 20 min Inkubation bei Raumtemperatur, 2 min Erhitzen auf 100°C und Abschrecken in Eis können die entstandenen kurzen Oligonukleotide wiederum 5'-³²P-markiert werden ("sekundäre" Phosphorylierung).

Partielle Spaltungen der 5'-markierten Oligonukleotide mittels verschiedener Enzyme:

Alle Reaktionsbedingungen sind in Tab. 7 aufgeführt.

Nuklease P_1 greift Oligonukleotide (RNA und DNA) weitgehend unspezifisch und statistisch an, wobei unter limitierenden Bedingungen verschieden lange 5'-Phosphat-Oligonukleotide entstehen. Durch geeignete Wahl der Enzymkonzentration und der Inkubationszeiten erhält man alle möglichen Abbauprodukte (124). Bei hoher RNA-Konzentration im Spaltansatz (viel carrier-RNA vorhanden) wird nach Rezept P_1 ① (Tab. 7) verfahren, ist die RNA-Konzentration gering, so führt man die Spaltung nach Rezept P_1 ② (Tab. 7) durch.

Schlangengiftphosphodiesterase ist eine Exonuklease, die RNA vom freien 3'-OH-Ende her schrittweise, 5'-Phosphatmononukleotide liefernd, abbaut. Durch den schrittweisen Abbauvorgang können aufeinanderfolgende Zwischenprodukte eines 5'- ^{32}P -markierten Oligonukleotids isoliert und damit dessen Sequenz bestimmt werden (125).

Für die Sequenzermittlung langer 5'- ^{32}P -markierter RNA-Fragmente mit Hilfe der von Donis-Keller et al. (46) und Simonsits et al. (47) entwickelten Methode der RNA-Sequenzierung auf Polyacrylamidgelen sind kontrollierte Spaltungen mit verschiedenen spezifischen und unspezifischen Ribonukleasen notwendig: Die Ribonukleasen T_1 , U_2 und A liefern partielle Abbauprodukte, die jeweils auf Guanosin (RNase T_1), Adenosin (RNase U_2) und Pyrimidin (RNase A) endigen. Ribonuklease Phy I ist dadurch charakterisiert, daß sie alle Phosphodiesterbindungen außer CpN-Bindungen spalten soll (32, 47, 48). Ribonuklease T_2 greift alle Phosphodiesterbindungen mehr oder weniger gleich gut, d. h. statistisch an.

a	b	c	d	e	f
P ₁ ①	0,05 µg / 5 µg	10	50 mM NH ₄ Ac (pH 5,3)	0, 5, 10, 20 min (20°C)	mit 1 µl 25 mM Na ₂ EDTA 4 min auf 100°C
P ₁ ②	0,005 µg / 10 µg			0, 2, 5, 10 min (50°C)	
SPDase	10 µg / 5 µg	50	5 mM Kalium- Phosphat, 50 mM Tris-HCl (pH 8,6)	1, 2, 4, 8, 16, 32, 64 min (20°C)	2 min auf 100°C
T ₁	0,1 E / 10 µg	10	7 M Harnstoff, 1 mM Na ₂ EDTA, 0,03 % XC + BB, 20 mM Na- Citrat (pH 5,0)	*15 min (50°C)	Trockeneis
1/10 T ₁	0,01 E / 10 µg				
A	2 x 10 ⁻⁵ E / 10 µg				
1/10 A	2 x 10 ⁻⁶ E / 10 µg				
T ₂	0,1 E / 10 µg				
1/10 T ₂	0,01 E / 10 µg				
U ₂	2 E / 10 µg				
Phy I	3,5 x 10 ⁻³ E / 20 µg	10	4 mM Na ₂ EDTA, 0,03 % XC + BB, 150 mM NaAc (pH 4,5)	*15 min (50°C)	auf 5 mg Harnstoff pipettieren →Trockeneis

Tab. 7: Bedingungen für den kontrollierten, partiellen Abbau 5'-³²P-markierter Oligonukleotide zwecks deren Sequenzermittlung durch verschiedene Enzyme (P₁ ① und P₁ ②: Nuklease P₁; SPDase: Schlangengiftphosphodiesterase; T₁ und 1/10 T₁: RNase T₁; A und 1/10 A: RNase A; T₂ und 1/10 T₂: RNase T₂; U₂: RNase U₂; Phy I: RNase Phy I).

(a): Bezeichnung des Spaltansatzes
(b): Enzymmenge pro eingesetzte RNA-Menge
(c): Reaktionsvolumen in µl
(d): Puffer
(e): Inkubationsdauer; in Klammern: Inkubations-
temperatur; *: 5 min Vorinkubation bei 50°C
(f): Beenden der Reaktion
XC = Xylen-Cyanol; BB = Bromphenolblau.

4.2.2. Darstellung von γ - ^{32}P -ATP

Die Darstellung von γ - ^{32}P -ATP, im Prinzip von Glynn und Chappell entwickelt (126), beruht auf einer enzymatischen Austauschreaktion zwischen $\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ und der terminalen γ -Phosphatgruppe von Adenosintriphosphat.

Nach der folgenden Vorschrift erhält man γ - ^{32}P -ATP mit einer spezifischen Aktivität von 180 - 200 Ci/mM:

H_2O	316,0 μl
1 M Tris-HCl, pH 8,0	25,5 μl
0,2 M MgCl_2	16,0 μl
40 mM reduziertes Glutathion	25,5 μl
10 mM 3-Phosphoglycerinsäure	18,0 μl
5 mM ATP	22,5 μl $\hat{=}$ 0,11 μMol
$\text{H}_3^{32}\text{PO}_4$ 50 mCi	trägerfrei
3-Phosphoglyceratkinase/ Glycerinaldehyd-3-Phosphat- dehydrogenase (1:1, 6 mg/ml)	9,0 μl
Reaktionsvolumen	423,5 μl
Inkubation	1 h bei 30°C

Nach der Inkubation wird ein Aliquot (0,5 μl) entnommen, auf PEI-Folie dünnsschichtchromatographisch aufgetrennt und nach Autoradiographie des Chromatogramms das Verhältnis $^{32}\text{P}_i$: γ - ^{32}P -ATP nach Ausschneiden des ^{32}P -Phosphats und des γ - ^{32}P -ATPs durch Messen der Čerenkov-Strahlung bestimmt.

Die Austauschreaktion wird durch Zugabe von 3 ml eiskaltem 0,01 M TEAB (pH 8,0) beendet. Nicht umgesetztes radioaktives Phosphat wird durch Säulenchromatographie vom radioaktiv markierten ATP abgetrennt (Abb. 42).

4.2.3. In vitro 5'-³²P-Phosphorylierung von RNA und RNA-Oligonukleotiden

Bei der in vitro 5'-Phosphorylierung von RNA und RNA-Oligonukleotiden überträgt 5'-Polynukleotidkinase aus T4 Phagen - infizierten E. coli die radioaktive γ -Phosphatgruppe von γ -³²P-ATP auf das freie 5'-OH-Ende der RNA bzw. des Oligonukleotids, wodurch diese am 5'-Ende mit ³²P markiert werden (30, 31).

Es gilt dabei folgende Vorschrift:

0,025 A₂₆₀-Einheiten kurzer Oligonukleotide (aus einer vollständigen Spaltung) bzw. 0,1 - 0,2 A₂₆₀-Einheiten langer RNA-Fragmente (aus einer partiellen Spaltung) oder 0,1 A₂₆₀-Einheiten linearer RNA werden in 5 μ l 100 mM TEAB-Puffer (pH 8,0) mit 10 μ l 0,3 mM γ -³²P-ATP, 0,5 μ l 400 mM MgCl₂, 0,5 μ l 34 mM Spermin, 1 μ l 300 mM Mercaptoäthanol und 4 μ l 5'-Polynukleotidkinase (1 E/ μ l) versetzt und 30 min bei 37°C inkubiert (31, 60, 125).

Sollen die auf diese Weise 5'-³²P-markierten Oligonukleotide oder RNAs anschließend durch zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt werden, dann schließt sich sofort ein zweiminütiges Erhitzen der Probe auf 100°C und Abschrecken derselben in Eis an. Erfolgt die anschließende Trennung des 5'-markierten Materials durch Hochspannungselektrophorese und Homo- bzw. Gradienten-Dünnschichtchromatographie, so muß vorher überschüssiges γ -³²P-ATP entfernt, d. h. durch Zugabe von Glucose und Hexokinase in Glucose-6-³²P-Phosphat überführt werden. Obige Reaktionsmischung wird also mit 4 μ l 10 mM Glucose und 1 μ l Hexokinase (0,1 μ g/ μ l) 5 min bei 37°C behandelt. Zwei Isotopenverdünnungsschritte unter Zugabe von jeweils 1 μ l nicht radioaktiv markiertem ATP mit zehnminütiger Inkubation bei 37°C, Erhitzen auf

100°C und Abschrecken in Eis schließen diese Reaktionsfolge ab.

Die "sekundäre" in vitro 5'-Markierung mit γ -³²P-ATP und 5'-Polynukleotidkinase unterscheidet sich von dem gerade beschriebenen Verfahren nur dadurch, daß der Reaktionsansatz auf den vierten Teil verkleinert wird, da es sich hier um RNA-Mengen im Nanogramm-Bereich handelt, die aus Polyacrylamidgelelektrophorese-Fingerprints von "primär" ³²P-markierten RNA-Fragmenten isoliert worden waren (53).

4.2.4. Chromatographische und elektrophoretische Trennverfahren

4.2.4.1. Säulenchromatographie

a) Bei der Darstellung von γ - ^{32}P -ATP wird nach der Austauschreaktion nicht umgesetztes Phosphat vom radioaktiv markierten ATP abgetrennt.

Dazu wird das Reaktionsgemisch auf eine DEAE-Cellulose (DE 23) -Säule (Packungshöhe: 15 cm; Volumen: 2 ml; äquilibriert mit 0,01 M TEAB, pH 8,0) aufgetragen und mit einem linearen Gradienten von 0,01 M TEAB (pH 8,0; 40 ml) bis 1 M TEAB (pH 8,0; 40 ml) eluiert. Abb. 42 zeigt ein derartiges Elutionsdiagramm.

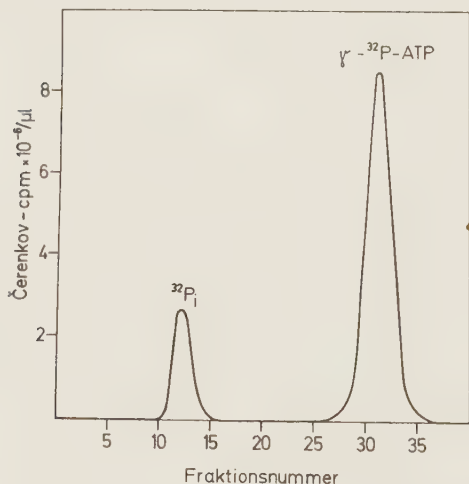


Abb. 42: Elutionsprofil von γ - ^{32}P -ATP über eine DEAE-Cellulose (DE 23) - Säule mit einem linearen Gradienten von 0,01 M TEAB, pH 8,0 (40 ml) bis 1 M TEAB, pH 8,0 (40 ml).

b) Nach Modifikation eines RNA-Fragments mit Bisulfit wurde überschüssiges Bisulfit durch Säulenchromatographie über eine Bio-Gel P-2 - Säule abgetrennt. Die Elution erfolgte mit 50 mM TEAB (pH 7,5).

4.2.4.2. Dünnschichtchromatographie

a) Durch eindimensionale Dünnschichtchromatographie auf Celluloseplatten können Nukleotide getrennt und identifiziert werden, wobei gleiches Laufverhalten unbekannter Nukleotide und authentischen Materials in verschiedenen Fließmitteln als Hinweis auf Identität gilt. Radioaktive Substanzen werden durch Autoradiographie sichtbar gemacht, nicht markierte Nukleotide durch Fluoreszenzlösung im UV-Licht von 254 nm Wellenlänge.

Zur Identifizierung von 3'-und 5'-Nukleotiden eignen sich folgende Laufmittel (127):

Laufmittel A: Isobuttersäure / konz. NH_3 / H_2O (pH 4,3)
577 : 38 : 385

Laufmittel B: t-Butanol / konz. HCl / H_2O
14 : 3 : 3

b) Zur schnellen analytischen Trennung von Phosphat und ATP bei der Darstellung von $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ eignet sich für die Bestimmung der Ausbeute eine Dünnschichtchromatographie auf PEI-Cellulose-Folie mit 0,8 M LiCl - 0,8 M Essigsäure als Laufmittel. Die Laufzeit beträgt ca. 10 min.

4.2.4.3. Zweidimensionale Auftrennung von Oligonukleotiden durch Hochspannungselektrophorese und Homo- oder Gradienten-Dünnschichtchromatographie

Oligonukleotide können durch eine Kombination von Hochspannungselektrophorese und Homo- bzw. Gradienten-Dünnschichtchromatographie zweidimensional getrennt werden.

Die Trennung in der ersten Dimension erfolgt vor allem nach Nukleotidzusammensetzung und besteht aus einer Hochspannungselektrophorese (5000 V) auf Celluloseacetat- oder Cello-gel-Streifen. Letztere besitzen eine größere Kapazität und sind nur zur Auftrennung größerer RNA-Mengen ($> 10 A_{260}$ -Einheiten) notwendig.

Als Elektrophoresepuffer im Tank dient 5 % Eisessig, 0,5 % Pyridin, 1 mM Na_2EDTA , pH 3,5, während der Streifen selbst in 5 % Essigsäure-Pyridin, 1 mM Na_2EDTA , 7 M Harnstoff, pH 3,5 getränkt wird (56).

Für die Fraktionierung in der zweiten Dimension werden die Oligonukleotide nach der von Southern beschriebenen Methode (61) auf DEAE-Cellulose-Dünnschichtplatten übertragen. Die Auftrennung, die im wesentlichen nach Kettenlänge erfolgt, geschieht durch Homochromatographie oder Gradienten-Dünnschichtchromatographie.

Bei der Homochromatographie handelt es sich um eine Verdrängungschromatographie, wobei als Laufmittel eine Mischung von Oligonukleotiden verschiedener Kettenlänge in 7 M Harnstoff dient, die man sich durch eine kontrollierte alkalische Hydrolyse von RNA herstellt.

RNA-Fragmente verschiedener Kettenlänge besitzen unterschiedliche Affinität zu den DEAE-Gruppen der Plattenbeschichtung. Die Oligonukleotide des Laufmittels konkurrieren untereinander und mit den zu trennenden markierten Oligonukleotiden um die Bindungsstellen an der DEAE-Cellulose. Kleine Oligonukleotide mit geringerer Affinität wer-

den von längeren mit höherer Affinität verdrängt, laufen also schneller. Auf diese Weise werden die radioaktiv markierten Oligonukleotide nach ihrer Ladung bzw. Kettenlänge fraktioniert.

Die Laufmittel für die Homochromatographie unterscheiden sich durch die statistische Länge der enthaltenen RNA-Bruchstücke. Diese Kettenlänge kann durch die KOH-Menge bei der Hydrolyse der RNA variiert werden:

Homochromatographielösungen, die in erster Linie kürzere RNA-Bruchstücke enthalten, eignen sich besonders zur Auftrennung kurzer markierter Oligonukleotide, solche mit vorwiegend langen RNA-Bruchstücken empfehlen sich für die Fraktionierung langer Oligonukleotide.

Darstellung und Zusammensetzung einer Homochromatographielösung (42, 128):

3 % Na-Nukleinat aus Hefe

7 M Harnstoff

2 bis 100 mM KOH

Hydrolyse: 20 h bei 65°C

anschließend: Stabilisierung durch Einstellen der Lösung auf pH 4,7 mittels Eisessig.

Da nach der homochromatographischen Auftrennung der radioaktiv markierten Oligonukleotide diese nur zusammen mit einer großen Menge nicht-markierter RNA (aus der Homochromatographielösung, bis zu 1 mg/cm² Celluloseschicht) von der Dünnschichtplatte isoliert werden können, wurde als Alternative zur Homochromatographie und für die Auftrennung unmarkierter Oligonukleotide die Gradienten-Dünnschichtchromatographie entwickelt (52):

Die Chromatographie erfolgt durch Anlegen eines Ammoniumformiat-Gradienten in 9 M Harnstoff und 1 mM Na₂EDTA, pH 5,5. Der Gradient wird während der chromatographischen

Auftrennung durch kontinuierliches Zutropfen von 120 ml des höhermolaren zu 120 ml des niedermolaren Laufmittels erzeugt, wobei letzteres sich von Anfang an im Tank befindet. Die mittels einer Schlauchpumpe zugetropfte höhermolare Lösung wird im Tank durch einen Magnetrührer mit der Tanklösung vermischt; Abb. 2 zeigt eine entsprechende Vorrichtung.

Gemeinsam ist den beiden Verfahren der Homo- und Gradienten-Dünnschichtchromatographie eine vorausgehende, einstündige Chromatographie in Wasser, sowie die Arbeitstemperatur von 65°C.

Von den zweidimensionalen Auftrennungen 5'-³²P-markierter Oligonukleotide können Autoradiographien angefertigt werden. Sofern es sich um die Auftrennung unmarkierter Oligonukleotide handelt, können die im UV-Licht sichtbaren Oligonukleotide mit Dia-Farbfilm fotografiert werden.

Sequenzanalyse mittels Homochromatographie:

Die Fingerprints der kontrollierten Spaltungen von 5'-³²P-markierten Oligonukleotiden mit Nuklease P₁ oder Schlangengiftphosphodiesterase dienen der Sequenzermittlung. Die dafür notwendigen Informationen erhält man aus der Lage der einzelnen 5'-markierten Abbauprodukte des Oligonukleotids zueinander. Der Abstand zwischen zwei Abbauprodukten in Laufrichtung der Homochromatographie läßt erkennen, ob ein Purin (großer Abstand) oder ein Pyrimidin (kleiner Abstand) abgespalten wurde. Der Winkel der Verbindungslinie zwischen zwei aufeinanderfolgenden Oligonukleotiden ermöglicht es dann außerdem, zwischen Guanosin und Adenosin bzw. Cytidin und Uridin zu unterscheiden. So kann die Sequenz eines Oligonukleotids aus der Reihenfolge der schrittweise abgespaltenen Nukleotide ermittelt werden, und zwar bis zu maximal ca. 20 Nukleotiden am 5'-Ende eines Oligonukleotids oder einer RNA. Abb. 43 zeigt ein Beispiel.

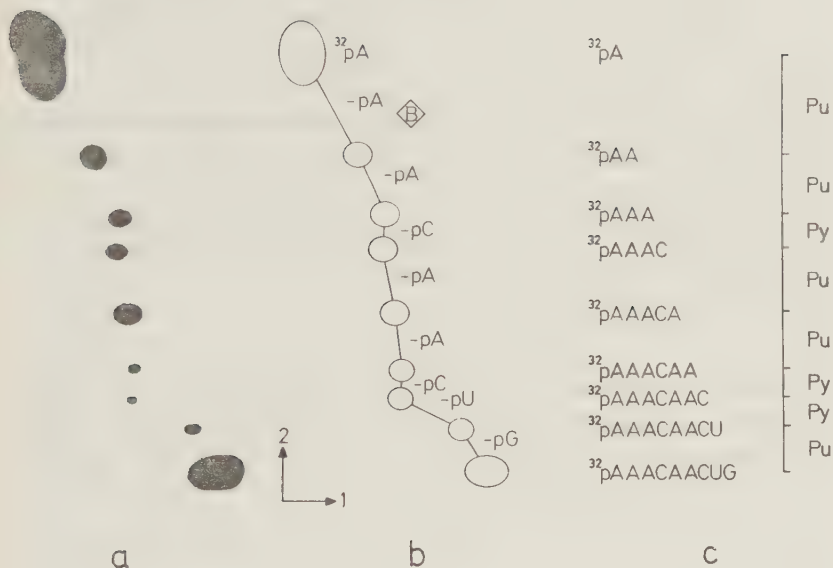


Abb. 43: Bestimmung der Sequenz eines 5'-³²P-markierten Oligonukleotids (AAACAACUG) durch kontrollierte Spaltung mit Nuklease P₁ und anschließende zweidimensionale Hochspannungselektrophorese (1. Dimension) und Homochromatographie (2. Dimension).

(a): Autoradiographie
 (b): Schematische Darstellung von (a)
 (c): Die Sequenzen der in (a) als schwarze Flecken sichtbaren Abbauprodukte von pAAACAACUG.
 Pu = Purin; Py = Pyrimidin; B = Lage des Farbstoffs Xylen-Cyanol.

4.2.4.4. Hochspannungselektrophorese auf DEAE-Papier

Zur Sequenzierung von 5'-³²P-markierten Oligonukleotiden bietet sich neben der beschriebenen Kombination von Hochspannungselektrophorese und Homochromatographie die Hochspannungselektrophorese (500 V) auf DEAE-Cellulose (DE81)-Papier an, mittels der die durch kontrollierte Partialspaltung mit Nuklease P₁ oder Schlangengiftphosphodiesterase erhaltenen Abbauprodukte der 5'-³²P-markierten Oligonukleotide eindimensional aufgetrennt werden können.

Geeignete Elektrophoresepuffer sind entweder 7 % Ameisensäure, 1 mM Na₂EDTA, pH 1,7 oder 5 % Essigsäure-Pyridin, 1 mM Na₂EDTA, pH 3,5.

Die Sequenz eines Oligonukleotids wird aus den berechneten "M"-Werten (M = migration value) der einzelnen Abbauprodukte abgeleitet (56). Die Berechnung der "M"-Werte geschieht nach der Formel $M = x/y$, wobei y die Laufstrecke eines Oligonukleotids und x der Abstand zwischen diesem Oligonukleotid und seinem ersten Abbauprodukt ist. Der empirische Zusammenhang von "M"-Wert und abgespaltenem Nukleotid ist in Tab. 8 dargestellt (71).

"M"-Wert (pH 3,5)	"M"-Wert (pH 1,7)	abgespaltenes Nukleotid
0,6 - 1,2	0,05 - 0,3	pC
2,1 - 2,9	0,4 - 1,1	pA
1,7 - 1,9	1,5 - 2,5	pU
2,6 - 4,4	1,2 - 3,1	pG

Tab. 8: Zusammenhang zwischen "M"-Wert und abgespaltenem Nukleotid nach Brownlee (71).

Die Sequenzbestimmung mit Hilfe der eindimensionalen Hochspannungselektrophorese erlaubt eindeutige Aussagen nur für Fragmente, deren Kettenlänge 5 - 7 Nukleotide nicht übersteigt bzw. für die ersten (vom markierten 5'-Ende her) 5 - 7 Nukleotide eines längeren Fragments.

4.2.4.5. Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese zur Trennung langer 5'-phosphorylierter RNA-Fragmente

Für die präparative Auftrennung langer 5'-³²P-markierter RNA-Fragmente eignet sich eine zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen (55, 63).

In der 1. Dimension werden die 5'-phosphorylierten Oligonukleotide in einem sauren Gel nicht nur nach Kettenlänge, sondern vor allem auch nach Basenzusammensetzung getrennt. 100 ml Gellösung für dieses saure Gel enthalten:

9.5 g Acrylamid

0.5 g N,N'-Methylenbisacrylamid

42 g Harnstoff

2.5 ml 1 M Citronensäure

0.25 ml $\text{Fe}^{\text{II}}\text{SO}_4$ -Lösung (0.25 %-ig = 500 mg / 200 ml H_2O)

0.25 ml Ascorbinsäure (10 %-ig = 500 mg / 5 ml H_2O)

15 μl H_2O_2 (30 %-ig)

Elektrophoresepuffer:

25 mM Na-Citrat (pH 3,5)

4 mM Na_2EDTA

Das Gel (400 x 200 x 2 mm; Höhe x Breite x Dicke) läßt man über Nacht gut durchpolymerisieren und führt dann eine vierstündige Vorelektrophorese (200 V, 8 - 10 mA) durch,

bei der zu beachten ist, daß der Elektrophoresepuffer in den Taschen des Gels 7 M Harnstoff enthält.

Vor dem Auftragen der Hydrolysate auf das Gel werden diese mit der gleichen Menge einer Farbstofflösung (8 M Harnstoff, 25 mM Citronensäure, 10 mM Na₂EDTA, 0,3 % Bromphenolblau, 0,5 % Xylen-Cyanol) versetzt und 1 min im siedenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Auftragen beginnt die Elektrophorese bei 60 V und erst nach 2 h wird die Spannung auf 200 V (8 - 10 mA) erhöht. Nach ca. 15 h wird die Trennung beendet und eine Autoradiographie angefertigt (Exponierzeit: 1 - 2 min). Durch diese Autoradiographie lassen sich die aufgetrennten 5'-³²P-markierten Oligonukleotide auf dem Gel genau lokalisieren. Dieser Gelstreifen mit den eindimensional aufgetrennten Fragmenten wird ausgeschnitten und in ein 15- oder 20-prozentiges Gel (pH 8,3; 400 x 200 x 2 mm) einpolymerisiert.

100 ml Lösung für ein 20 %-iges (15 %-iges) Gel enthalten:

19 (14,25) g Acrylamid
1 (0,75) g N,N'-Methylenbisacrylamid
42 g Harnstoff
10 ml 0,9 M Tris-Borat - 40 mM Na₂EDTA (pH 8,3)
100 µl TEMED
50 µl Ammoniumperoxodisulfat (50 %-ig)

Nach 5 h, die dem gründlichen Durchpolymerisieren des Gels dienen, kann die Elektrophorese bei 300 V, 10 - 15 mA gestartet werden.

Elektrophoresepuffer:

90 mM Tris-Borat }
4 mM Na₂EDTA } pH 8,3

Die Auftrennung in der 2. Dimension dauert ca. 48 h.
Die anschließende Autoradiographie zeigt die Lage der 5'-markierten Fragmente auf dem Gel.

4.2.4.6. Eindimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese zur Sequenzierung langer 5'-phosphorylierter RNA-Fragmente

Mit Hilfe der von Donis-Keller et al. (46) und Simoncsits et al. (47) entwickelten Methode der Sequenzanalyse auf Polyacrylamidgelen läßt sich die Nukleotidsequenz langer 5'-³²P-markierter RNA-Fragmente bestimmen. Es wird dabei mit Gelen (430 x 350 x 1,5 mm) folgender Zusammensetzung gearbeitet:

100 ml Gellösung enthalten:

- 19,3 g Acrylamid
- 0,7 g N,N'-Methylenbisacrylamid
- 42 g Harnstoff
- 10 ml 0,5 M Tris-Borat - 10 mM Na₂EDTA (pH 8,3)
- 17 µl TEMED
- 67 µl Ammoniumperoxodisulfat (50 %-ig)

Die Gele läßt man über Nacht durchpolymerisieren.
Nach einer Vorelektrophorese bei 500 V (Elektrophorese-puffer: 50 mM Tris-Borat, 1 mM Na₂EDTA, pH 8,3) werden die verschiedenen Partialspaltungen eines 5'-³²P-markierten Oligonukleotids nebeneinander auf das Gel aufgetragen und die Elektrophorese wird mit 300 V gestartet; nach 1 h wird die Spannung auf 1000 V erhöht.

RNA-Fragmente mit einer Kettenlänge von ca. 26 Nukleotiden wandern mit dem Xylen-Cyanol-Farbstoff, während 7 - 8 Nukleotide lange Fragmente sich zusammen mit dem Bromphenol-

blau bewegen.

Nach der Elektrophorese wird eine der beiden Glasplatten, zwischen denen sich das Gel befindet, abgenommen, das Gel wird mit Haushaltsfolie bedeckt, und bei -20°C wird eine Autoradiographie angefertigt. Diese zeigt dann die mit den verschiedenen Enzymen erhaltenen und aufgetrennten partiellen Abbauprodukte des untersuchten 5'- ^{32}P -markierten Oligonukleotids:

In der Spalte, in der das partielle RNase T_2 - Hydrolysat aufgetrennt worden ist, werden alle Abbauprodukte des 5'- ^{32}P -Oligonukleotids, sofern sie dessen markiertes 5'-Ende enthalten, als Banden sichtbar. Da kurze Oligonukleotide eine höhere elektrophoretische Mobilität besitzen als lange, nimmt auf der Autoradiographie die Kettenlänge von unten nach oben zu.

Analog verhält es sich mit der Auftrennung der übrigen Hydrolysate, wobei bei diesen jedoch weniger Banden auftreten, da alle anderen eingesetzten Enzyme spezifisch nach ganz bestimmten Nukleotiden schneiden.

Als Kontrolle wird auch ein Reaktionsansatz, dem kein Enzym zugesetzt wurde, aufgetrennt. Das Schema einer derartigen Auftrennung zeigt die Abb. 44.

Mit dieser Methode kann die Reihenfolge von bis zu 80 Nukleotiden vom 5'-Ende her eines 5'- ^{32}P -markierten Fragments bestimmt werden.

4.2.5. Autoradiographie

Radioaktive Substanzen werden nach ihrer dünn-schicht-chromatographischen, papier- oder gelelektrophoretischen Auftrennung durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Die Exponierzeit beträgt je nach Radioaktivität zwischen 1 min und 6 Wochen.

Die Sequenzgele werden dazu bei -20°C im Tiefgefrierschrank gelagert, um Diffusion im Gel auszuschließen und dadurch die Schärfe der Banden zu erhalten. Durch Verstärkerfolien, die während des Exponierens auf dem Film liegen, kann zusätzlich die Intensität der Schwärzung erhöht und die Exponierzeit verkürzt werden.

4.2.6. Fotographische Dokumentation der Auftrennung unmarkierter Oligonukleotide

Mono- und Oligonukleotide können nach ihrer Auftrennung auf Dünnschichtplatten im UV-Licht der Wellenlänge 254 nm sichtbar gemacht werden.

Zur Dokumentation der Flecken wird die Dünnschichtplatte unter UV-Licht mit einem Kodak Ektachrome 64 Diafilm (ASA 64 / 19 DIN) unter Verwendung eines UV-Filters fotografiert. Die Diapositive werden auf einen Agfaortho 25 Professional-Film (ASA 25 / 15 DIN) unter Verwendung eines extrem harten Negativentwicklers (Dokumol) umkopiert. Von diesen Negativen können wiederum Positivabzüge gefertigt werden.

4.2.7. Isolierung 5'-phosphorylierter RNA-Fragmente

4.2.7.1. Isolierung nach zweidimensionaler Auftrennung über Hochspannungselektrophorese/Homo- oder Gradienten-Dünnschichtchromatographie

Nachdem die Lage der aufgetrennten, 5'-³²P-markierten Oligonukleotide durch Autoradiographie bestimmt worden ist, wird das auf der Dünnschichtplatte angezeichnete Material ausgekratzt. Das geschieht mit dem offenen Ende eines Glasröhrchens (3 x 50 mm), dessen anderes Ende verengt, mit Watte gefüllt und an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen ist. Mit 2 ml Äthanol werden Harnstoff und Salze aus dieser mit DEAE-Cellulose gefüllten Säule ausgewaschen. Die Oligonukleotide lassen sich mit 300 µl 2 M TEAB-Puffer (pH 8,5) eluieren. Die Proben werden im Vakuum über Phosphorpentoxid zur Trockene eingengt. Um das TEAB vollständig zu entfernen, wird noch zweimal in 200 µl Wasser aufgenommen und jeweils wieder zur Trockene abgezogen.

4.2.7.2. Isolierung nach zweidimensionaler Polyacrylamidgelelektrophorese

Auch hier werden die radioaktiv markierten Oligonukleotide durch Autoradiographie lokalisiert. Die entsprechenden Bereiche im Gel werden ausgeschnitten und die RNA elektrophoretisch aus dem Gel eluiert (64, 129). Abb. 45 zeigt schematisch die dafür notwendige Vorrichtung.

Die herausgeschnittenen, zerkleinerten Gelstückchen werden in eine im unteren Teil eine Konstriktion besitzende Pasteurpipette transferiert, die unten mit einem 5 %-igen Polyacrylamidgel abgedichtet wurde.

Zusammensetzung dieses 5 %-igen Gels (für 100 ml Gellösung):

- 4,75 g Acrylamid
- 0,25 g N,N'-Methylenbisacrylamid
- 5 ml Tris-HCl. 1 M, pH 7,5
- 100 μ l TEMED
- 40 μ l Ammoniumperoxodisulfat (50 %-ig)

Das Elutionsröhrchen ist unten mit einem Dialyseschlauch versehen, der mittels eines Parafilm-Streifens befestigt ist. Im Dialyseschlauch befindet sich in 300 μ l Elektro-phoresepuffer (50 mM Tris-HCl. pH 7,5) 1 A_{260} -Einheit tRNA. Das Röhrchen taucht mit seinen beiden Enden in zwei mit 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) gefüllte Elektrophoresekammern ein. Die Elektrophorese erfolgt in 8 h bei einer Stromstärke von 2 mA pro Röhrchen.

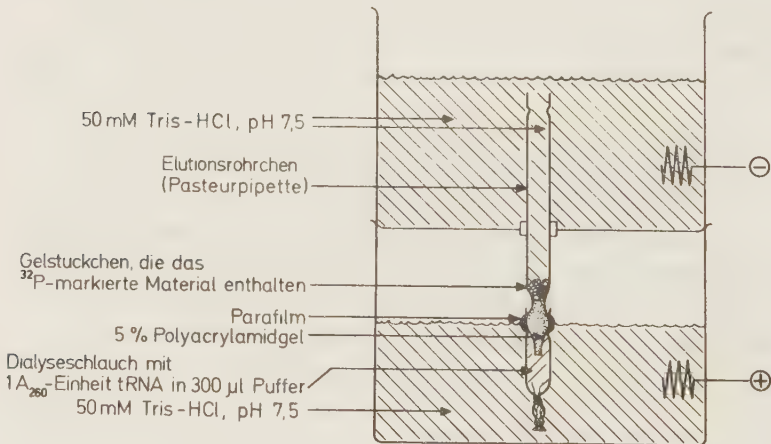


Abb. 45: Vorrichtung zur elektrophoretischen Elution von ^{32}P -markierten Oligonukleotiden aus Polyacrylamidgel.

Die RNA (nach der elektrophoretischen Elution: tRNA + 5'-³²P-markiertes Oligonukleotid) wird mit 30 µl 2 M NaAc (pH 5,0) und 700 µl Äthanol bei -20°C gefällt, abzentrifugiert, der Überstand wird abgegossen und verworfen, das Präzipitat wird im Exsikkator getrocknet.

Falls es notwendig ist, die 5'-³²P-markierten Oligonukleotide RNA-frei zu isolieren, befinden sich bei der Elektrophorese im Dialyseschlauch 300 µl Tris-HCl (50 mM, pH 7,5) ohne tRNA, und das spätere Entsalzen der Probe geschieht durch Dialyse gegen 1 M NaCl (1 h) und darauf gegen destilliertes Wasser (2 x 2 h). Im Exsikkator werden die Proben anschließend über Phosphorpentoxid zur Trockene eingeengt.

5. Zusammenfassung

Viroide, eine neue Klasse von Pathogenen, die bisher nur in höheren Pflanzen gefunden wurden, sind infektiöse Ribonukleinsäuren, die sich von klassischen Viren durch das Fehlen eines Hüllproteins und ihr geringes Molekulargewicht unterscheiden.

- a) Das Viroid der Spindelknollensucht der Kartoffel (PSTV, potato spindle tuber viroid) wurde mit Ribonuklease T_1 bzw. Ribonuklease A gespalten, die entstandenen Oligonukleotide wurden - nach Phosphatasebehandlung - mittels γ - 32 P-ATP und 5'-Polynukleotidkinase in vitro 5'- 32 P-markiert und zweidimensional durch Hochspannungselektrophorese und Homo- oder Gradienten-Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. Nach kontrollierter Spaltung der isolierten Oligonukleotide mit Nuklease P_1 oder Schlangengiftphosphodiesterase und Auftrennung der Abbauprodukte mittels Elektrophorese auf DEAE-Papier und/oder Hochspannungselektrophorese/Homochromatographie konnten die Nukleotidsequenzen bestimmt werden.
- b) Die Entwicklung einer Dünnschichtchromatographie an DEAE-Cellulose mittels Ammoniumformiat-Gradienten in 9 M Harnstoff als Alternative zur Homochromatographie erwies sich dabei als Voraussetzung für die Eliminierung einiger bei der Sequenzanalyse auftretender Schwierigkeiten, da die Oligonukleotide, die mittels dieses neuen Verfahrens aufgetrennt werden, anschließend RNA-frei isoliert werden können. Im Gegensatz zur Homochromatographie ist auch eine Auftrennung unmarkierter Oligonukleotide möglich. Die mittels der Gradienten-Dünnschichtchromatographie produzierten Fingerprints sind identisch mit den durch Homochromatographie erhaltenen.
- c) Lange, überlappende Fragmente von PSTV wurden durch kontrollierte Spaltung mit verschiedenen Nukleasen erhalten.

Diese langen Oligonukleotide wurden in vitro mit γ -³²P-ATP markiert und durch zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Die aus dem Gel mittels elektrophoretischer Elution extrahierten Oligonukleotide wurden nach kontrollierter Spaltung mit geeigneten Ribonukleasen sowohl durch Hochspannungselektrophorese/Homochromatographie als auch mittels neuer Methoden durch Elektrophorese in Polyacrylamidgelen sequenziert.

- d) Probleme, die sich aus der zum Teil schlechten Unterscheidbarkeit der Pyrimidine oder aus der Sekundärstruktur einzelner Fragmente beim Sequenzieren mittels Polyacrylamidgelelektrophorese ergaben, konnten mit Hilfe einer neu entwickelten Fingerprint-Methode für RNA-Mengen im Nanogramm-Bereich gelöst werden. Dieses neue Verfahren war, genauso wie die Gradienten-Dünnschichtchromatographie, zunächst an 5S rRNA entwickelt und erprobt worden: Durch kontrollierte Spaltung von 5S rRNA erzeugte RNA-Fragmente wurden 5'-³²P-markiert ("primäre" Phosphorylierung) und nach zweidimensionaler Auftrennung über Polyacrylamidgelelektrophorese durch elektrophoretische Elution RNA-frei isoliert. Diese 5'-markierten Fragmente (jeweils ca. 10 ng) wurden mit RNase T₁ bzw. RNase A vollständig gespalten, die entstandenen Oligonukleotide nach Phosphatasebehandlung 5'-³²P-markiert ("sekundäre" Phosphorylierung) und zweidimensional durch Hochspannungselektrophorese/Homochromatographie aufgetrennt. Sowohl methodisch als auch in den erzielten Ergebnissen entspricht diese Kombination "primärer" und "sekundärer" in vitro 5'-Phosphorylierungen den Fingerprint- und Sequenziertechniken für in vivo markierte RNA.
- e) Die durch Sequenzanalyse kurzer und langer Fragmente und anschließende Kombination und Auswertung der erhaltenen Daten ermittelte Primärstruktur von PSTV zeigt eine ring-

förmige, kovalent geschlossene Anordnung von 359 Nukleotiden (73 x Adenosin, 108 x Cytidin, 101 x Guanosin und 77 x Uridin). Modifizierte Nukleotide wurden bisher nicht gefunden. Die ermittelte Primärstruktur bestätigt endgültig die bereits früher beschriebene Zirkularität von PSTV.

- f) Unter der Voraussetzung einer größtmöglichen Anzahl von Basenpaaren wurde ein stäbchenförmiges Modell für die Sekundärstruktur erstellt, für das sich bei Berücksichtigung von Röntgenstrukturdaten für doppelsträngige RNA ein Achsenverhältnis von ca. 1:23 ergibt. Dieses Modell erklärt sehr gut die gemessene thermische Stabilität, die hohe Kooperativität und die elektronenmikroskopischen Befunde. Wegen der guten Übereinstimmung des durch hydrodynamische Experimente ermittelten Achsenverhältnisses von 1:20 mit dem aus dem vorgeschlagenen Sekundärstrukturmodell berechneten von 1:23 sind Tertiärstrukturwechselwirkungen bei PSTV nicht vorstellbar.
- g) Der mittels Fingerprintanalysen durchgeführte Vergleich von PSTV-tom mit zwei anderen Viroiden, die außerdem auf verschiedenen Wirtspflanzen propagiert worden waren, CEV-gyn und CSV-cin, offenbarte nicht nur die Individualität dieser einzelnen Viroide, sondern lieferte auch einen ersten Hinweis auf eine Polypurin-Sequenz als gemeinsames Strukturelement.

Durch die Erstellung der Primär- und Sekundärstruktur von PSTV ist zum ersten Mal die vollständige molekulare Struktur eines Krankheitserregers ermittelt worden.

6. Literaturverzeichnis

1. Diener, T. O. (1971) Virology 45, 411 - 428
2. Singh, R. P. und Clark, M. C. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 44. 1077 - 1083
3. Sänger, H. L. (1972) Adv. Biosci. 8, 103 - 116
4. Semancik, J. S. und Weathers, L. G. (1972) Nature New Biol. 237, 242 - 244
5. Diener T. O. und Hadidi. A. (1977) in "Comprehensive Virology". Herausgeber: Fraenkel-Conrat H. und Wagner, R. R., Plenum Press, New York, London, Vol. 11, 285 - 337
6. Van Dorst, H. J. M. und Peters, D. (1974) Neth. J. Plant Pathol. 80. 85 - 96
7. Hollings, M. und Stone, O. M. (1973) Annls appl. Biol. 74, 333 - 348
8. Diener, T. O. und Lawson, R. H. (1973) Virology 51, 94 - 101
9. Romaine, C. P. und Horst. R. K. (1975) Virology 64, 86 - 95
10. Randles, J.W. (1975) Phytopathology 65, 163 - 167
11. Randles, J.W., Rillo, E. P. und Diener, T. O. (1976) Virology 74, 128 - 139
12. Sasaki, M. und Shikata, E. (1977) Proc. Japan. Acad. 53, Ser. B, 109 - 112

13. Owens, R. A., Smith, D. R. und Diener, T. O. (1978)
Virology 89, 388 - 394
14. Sogo, J. M., Koller, T. und Diener, T. O. (1973)
Virology 55, 70 - 80
15. Sänger, H. L., Klotz, G., Riesner, D., Gross, H. J. und
Kleinschmidt, A. K. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA
73, 3852 - 3856
16. Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B. G., Brown, N. L.,
Coulson, A. R., Fiddes, J. C., Hutchison III, C. A.,
Slocombe, P. M. und Smith, M. (1977) Nature 265. 687 -
695
17. Godson, G. N., Barrell, B. G., Staden, R. und Fiddes, J.
C. (1978) Nature 276, 236 - 247
18. Fiers, W., Contreras, R., Duerinck, F., Haegeman, G.,
Iserentant, D., Merregaert, J., Min Jou, W., Molemans, F.,
Raeymaekers, A., Van den Berghe, A., Volckaert, G. und
Ysebaert, M. (1976) Nature 260, 500 - 507
19. Holley, R. W., Apgar, J., Everett, J. A., Madison, J. T.,
Marquisee, M., Merrill, S. H., Penswick, J. R. und Zamir,
A. (1965) Science 147, 1462 - 1465
20. Sprinzl, M., Gruter, F. und Gauss, D. H. (1978) Nucleic
Acids Res., Special Supplement, r15 - r27
21. Erdmann, V. A. (1978) Nucleic Acids Res., Special
Supplement, r1 - r13
22. Ehresmann, C., Stiegler, P., Carbon, P. und Ebel, J. P.
(1977) FEBS Lett. 84. 337 - 341
23. McReynolds, L., O'Malley, B. W., Nisbet, A. D., Fother-
gill, J. E., Givol, D., Fields, S., Robertson, M. und
Brownlee, G. G. (1978) Nature 273, 723 - 728

24. Hagenbüchle, O., Santer, M., Steitz, J. A. und Mans, R. J. (1978) Cell 13, 551 - 563
25. Sanger, F. und Coulson, A. R. (1975) J. Mol. Biol. 94, 441 - 448
26. Maxam, A. M. und Gilbert, W. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 560 - 564
27. Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463 - 5467
28. Maat, J. und Smith, A. J. H. (1978) Nucleic Acids Res. 5, 4537 - 4545
29. Wittig, B. und Wittig, S. (1978) Nucleic Acids Res. 5, 1165 - 1178
30. Szekely, M. und Sanger, F. (1969) J. Mol. Biol. 43, 607 - 617
31. Simsek, M., Ziegenmeyer, J., Heckman, J. und RajBhandary, U. L. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1041 - 1045
32. Gupta, R. C. und Randerath, K. (1977) Nucleic Acids Res. 4, 3441 - 3454
33. Commerford, S. L. (1971) Biochemistry 10, 1993 - 2000
34. Sängler, H. L., Domdey, H. und Gross, H. J. (1977) Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 358, 294 - 295
35. Sängler, H. L. und Ramm, K. (1975) in "Modification of the information content of plant cells", Herausgeber: Markham, R., Davies, D. R., Hopwood, D. A. und Horne, R. W., North-Holland Publishing Company, Amsterdam, 229 - 252

36. Hadidi, A., Diener, T. O. und Modak, M. J. (1977) FEBS Lett. 75, 123 - 127
37. Owens, R. A. (1978) Virology 89, 380 - 387
38. Dickson, E., Prenskey, W. und Robertson, H. D. (1975) Virology 68, 309 - 316
39. Dickson, E., Diener, T. O. und Robertson, H. D. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 951 - 954
40. Dickson, E., Robertson, H. D., Niblett, C. L., Horst, R. K. und Zaitlin, M. (1979) Nature 277, 60 - 62
41. Dickson, E., Pape, L. K. und Robertson, H. D. (1979) Nucleic Acids Res. 6, 91 - 110
42. Gillum, A. M., Urquhardt, N., Smith, M. und RajBhandary, U. L. (1975) Cell 6, 395 - 405
43. Gillum, A. M., Roe, B. A., Anandaraj, M. P. J. S. und RajBhandary, U. L. (1975) Cell 6, 407 - 413
44. Koper-Zwarthoff, E. C., Lockard, R. E., Alzner-DeWeerd, B., RajBhandary, U. L. und Bol, J. F. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5504 - 5508
45. Pirtle, R. M., Pirtle, I. L. und Inouye, M. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 2190 - 2194
46. Donis-Keller, H., Maxam, A. M. und Gilbert, W. (1977) Nucleic Acids Res. 4, 2527 - 2538
47. Simoncsits, A., Brownlee, G. G., Brown, R. S., Rubin, J. R. und Guillely, H. (1977) Nature 269, 833 - 836
48. Pilly, D., Niemeyer, A., Schmidt, M. und Bargetzi, J. P. (1978) J. Biol. Chem. 253, 437 - 445

49. Carbon, P., Ehresmann, C., Ehresmann, B. und Ebel, J. P.
(1978) FEBS Lett. 94, 152 - 156
50. Winter, G. und Brownlee, G. G. (1978) Nucleic Acids Res.
5, 3129 - 3139
51. Martin, R. P., Sibling, A. P., Schneller, J. M., Keith, G.,
Stahl, A. J. C. und Dirheimer, G. (1978) Nucleic Acids
Res. 5, 4579 - 4592
52. Domdey, H. und Gross, H. J. (1979) Anal. Biochem., im
Druck
53. Domdey, H. und Gross, H. J. (1979) Anal. Biochem. 93,
321 - 328
54. De Wachter, R. und Fiers, W. (1972) Anal. Biochem. 49,
184 - 197
55. Lockard, R. E., Alzner-DeWeerd, B., Heckman, J. E.,
MacGee, J., Tabor, M. W. und RajBhandary, U. L. (1978)
Nucleic Acids Res. 5, 37 - 56
56. Sanger, F., Brownlee, G. G. und Barrell, B. G. (1965)
J. Mol. Biol. 13, 373 - 398
57. Brownlee, G. G. und Sanger, F. (1969) Eur. J. Biochem. 11,
395 - 399
58. Jeppesen, P. G. N. (1971) Biochem. J. 124, 357 - 366
59. Alberty, H. Raba, M. und Gross, H. J. (1978) Nucleic
Acids Res. 5, 425 - 434
60. Gross, H. J., Domdey, H., Lossow, C., Jank, P., Raba, M.,
Alberty, H. und Sänger, H. L. (1978) Nature 273, 203 - 208
61. Southern, E. M. (1974) Anal. Biochem. 62, 317 - 318

62. Riesner, D., Henco, K., Rokohl, U., Klotz, G., Kleinschmidt, A. K., Domdey, H., Jank, P., Gross, H. J. und Sänger, H. L. (1979) J. Mol. Biol., im Druck
63. Walker, R. T. und RajBhandary, U. L. (1978) Nucleic Acids Res. 5, 57 - 70
64. Knecht, M. E. und Busch, H. (1971) Life Sci. 10, 1297 - 1309
65. Labrie, F. und Sanger, F. (1969) Biochem. J. 114, 29P
66. Hori, H. (1976) Molec. gen. Genet. 145, 119 - 123
67. Domdey, H., Jank, P., Sänger, H. L. und Gross, H. J. (1978) Nucleic Acids Res. 5, 1221 - 1236
68. Cameron, V. und Uhlenbeck, O. C. (1977) Biochemistry 16, 5120 - 5126
69. Richardson, C. C. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2, 815 - 828
70. Singh, R. P., Michniewicz, J. J. und Narang, S. A. (1976) Can. J. Biochem. 54, 600 - 608
71. Brownlee, G. G. (1972) "Determination of Sequences in RNA", Herausgeber: Work, T. S. und Work, E., North-Holland Publishing Company, Amsterdam
72. Shapiro, R., Servis, R. E. und Welcher, M. (1970) J. Amer. Chem. Soc. 92, 422 - 424
73. Hayatsu, H., Wataya, Y., Kai, K. und Jida, S. (1970) Biochemistry 9, 2858 - 2864
74. Goddard, J. P. und Shulman, L. H. (1972) J. Biol. Chem. 247, 3864 - 3867

75. Volckaert, G., Min Jou, W. und Fiers, W. (1976) Anal. Biochem. 72, 433 - 446
76. Anfinsen, C. B., Cuatrecasas, P. und Taniuchi, H. (1971) in "The Enzymes", Herausgeber: Boyer, P. D., Academic Press, New York und London, Vol. IV, 177 - 204
77. Kallenbach, N. R. und Berman, H. M. (1977) Q. Rev. Biophys. 10, 138 - 236
78. Palukaitis, P. und Symons, R. H. (1978) FEBS Lett. 92, 268 - 272
79. McClements, W. L. und Kaesberg, P. (1977) Virology 76, 477 - 484
80. Owens, R. A., Erbe, E., Hadidi, A., Steere, R. L. und Diener, T. O. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3859 - 3863
81. Hadidi, A. und Diener, T. O. (1978) Virology 86, 57 - 65
82. Diener T. O., Hadidi, A. und Owens, R. A. (1977) in "Methods in Virology: Methods for studying viroids", Herausgeber: Maramorosch, K. und Koprowski, H., Academic Press Inc., New York, Vol. VI, 185 - 217
83. Hadidi, A. und Diener, T. O. (1977) Virology 78, 99 - 107
84. Wintermeyer, W. und Zachau, H. G. (1973) Biochem. Biophys. Acta 299, 82 - 90
85. Sänger, H. L., Ramm, K., Domdey, H., Gross, H. J., Henco, K. und Riesner, D. (1979) FEBS Lett., 99, 117 - 122
86. Gross, H. J., Domdey, H. und Sänger, H. L. (1977) Nucleic Acids Res. 4, 2021 - 2028

87. Hadidi, A. und Keith, J. M. (1978) J. Supramolec. Structure S 2, 280
88. Morris, T. J. (1979) Intervirology 11, 89 - 96
89. Forget, B. G. und Weissman, S. M. (1967) Science 158, 1695 - 1699
90. Rich, A. und RajBhandary, U. L. (1976) Ann. Rev. Biochem. 45, 805 - 860
91. Quigley, G. J. und Rich, A. (1976) Science 194, 796 - 806
92. Vlassov, V. V., Pusyriov, A. T. und Gross, H. J. (1978) FEBS Lett. 94, 157 - 160
93. Davies, J. W., Kaesberg, P. und Diener, T. O. (1974) Virology 61, 281 - 285
94. Hall, T. C., Wepprich, R. K., Davies, J. W., Weathers, L. G. und Semancik, J. S. (1974) Virology 61, 486 - 492
95. Brown, J. C. und Smith, A. E. (1970) Nature 226, 610 - 612
96. Stewart, J. W., Sherman, F., Shipman, N. A. und Jackson, M. (1971) J. Biol. Chem. 246, 7429 - 7445
97. Kozak, M. (1978) Cell 15, 1109 - 1123
98. Maizels, N. (1974) Nature 249, 647 - 649
99. Shine, J. und Dalgarno, L. (1975) Nature 254, 34 - 38
100. Steitz, J. A. und Steege, D. A. (1977) J. Mol. Biol. 114, 545 - 558
101. Shatkin, A. J. (1976) Cell 9, 645 - 653

102. Rose, J. K. (1975) J. Biol. Chem. 250, 8098 - 8104
103. Lockard, R. E. und Lane, C. (1978) Nucleic Acids Res. 5, 3237 - 3247
104. Setlov, P. (1976) in "Handbook of Biochemistry and Molecular Biology - Nucleic Acids", Herausgeber: Fasman, G. D., CRC Press, Cleveland, Ohio, 2, 312
105. Marotta, C. A., Wilson, J. T., Forget, B. G. und Weissman, S. M. (1977) J. Biol. Chem. 252, 5040 - 5053
106. Efstratiadis, A., Kafatos, F. C. und Maniatis, T. (1977) Cell 10, 571 - 585
107. Pan, J., Reddy, V. B., Thimmappaya, B. und Weissman, S. M. (1977) Nucleic Acids Res. 4, 2539 - 2548
108. Reddy, V. B., Dhar, R. und Weissman, S. M. (1978) J. Biol. Chem. 253, 621 - 630
109. Schwartz, R. M. und Dayhoff, M. O. (1978) Science 199, 395 - 403
110. Matthews, R. E. F. (1978) Nature 276, 850
111. Hadidi, A., Jones, D. M., Gillespie, D. H., Wong-Stahl, F. und Diener, T. O. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2453 - 2457
112. Grill, L. K. und Semancik, J. S. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 896 - 900
113. Singh, R. P. und O'Brien, M. J. (1970) Am. Potato J. 47, 367 - 371
114. Singh, R. P. (1971) Phytopathology 61, 1034 - 1035

115. Diener, T. O., Smith, D. R. und O'Brien, M. J. (1972)
Virology 48, 844 - 846
116. Semancik, J. S. und Weathers L. G. (1972) Virology 47,
456 - 466
117. Singh, R. P. (1973) Am. Potato J. 50, 111 - 123
118. Semancik, J. S., Magnuson, D. S. und Weathers, L. G.
(1973) Virology 52, 292 - 294
119. Singh, R. P. und Clark, M. C. (1973) FAO Plant. Prot.
Bull. 21, 121 - 125
120. Henco, K., Riesner, D. und Sänger, H. L. (1977) Nucleic
Acids Res. 4, 177 - 194
121. Panet, A., van de Sande, J. H., Loewen, P. C., Khorana,
H. G., Raae, A. J., Lillehaug, J. R. und Kleppe, K.
(1973) Biochemistry 12, 5045 - 5050
122. Contreras, R. und Fiers, W. (1971) FEBS Lett. 16, 281 -
283
123. Fujimoto, M., Kuninaka, A. und Yoshino, H. (1969)
Agric. Biol. Chem. 33, 1517 - 1518
124. Silberklang, M., Gillum, A. M. und RajBhandary, U. L.
(1977) Nucleic Acids Res. 4, 4091 - 4108
125. Silberklang, M., Prochiantz, A., Haenni, A. L. und
RajBhandary, U. L. (1977) Eur. J. Biochem. 72, 465 - 478
126. Glynn, I. M. und Chappell, J. B. (1964) Biochem. J. 90,
147 - 149
127. Wildenauer, D. und Gross, H. J. (1974) Nucleic Acids
Res. 1, 279 - 288

128. Jay, E., Bambara, R., Padmanabhan, R. und Wu, R. (1974)
Nucleic Acids Res. 1, 177 - 194
129. Lockard, R. E. und RajBhandary, U. L. (1976) Cell 9,
747 - 760
130. Goddard, J. P. und Maden, B. E. H. (1976) Nucleic
Acids Res. 3, 431 - 440
131. Jank, P. (1977) Dissertation, Universität München

Lebenslauf

- Zur Person: Am 29. Oktober 1951 wurde ich als Sohn des Elektrikers Alfred Domdey und seiner Ehefrau Marianne, geb. Jaworski, in Sulzbach-Rosenberg geboren.
Seit 1976 bin ich mit der Sekretärin Barbara Domdey, geb. Birzer, verheiratet.
- Schulbildung: 1957 - 1961: Volksschule in Sulzbach-Rosenberg
1961 - 1970: Mathematisch-Naturwissenschaftliches Gymnasium in Sulzbach-Rosenberg
Sommer 1970: Reifeprüfung
- Studium: 1970 - 1975: Studium der Chemie und Biologie an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen
Herbst 1975: Staatsexamen für das höhere Lehramt an Gymnasien
1976 - 1979: Studium im Fach "Chemie/Promotion" an der Ludwig-Maximilians-Universität München;
Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried

